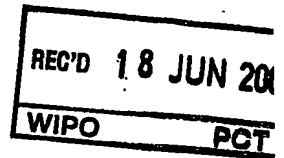


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PCT/EP200 4 /

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

103 10 261.2

Anmeldetag:

05. März 2003

Anmelder/Inhaber:

Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung eV,
80636 München/DE

Bezeichnung:

Identifizierung von Antigen-Epitopen

IPC:

G 01 N, B 82 B, C 12 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 18. März 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Stanschus

BEST AVAILABLE COPY

Gleiss & Große

Patentanwälte · Rechtsanwälte
European Patent Attorneys
European Trademark Attorneys

Intellectual Property Law
Technology Law

Leitzstraße 45
D-70469 Stuttgart
Telefon: +49 (0)711 99 3 11-0
Telefax: +49 (0)711 99 3 11-200
E-Mail: office@gleiss-grosse.com
Homepage: www.gleiss-grosse.com

Dr. jur. Alf-Olav Gleiss · Dipl.-Ing. · PA
Rainer Große · Dipl.-Ing. · PA
Dr. Andreas Schrell · Dipl.-Biol. · PA
Torsten Armin Krüger · RA
Nils Helde · RA
Armin Eugen Stockinger · RA
Georg Brisch · Dipl.-Ing. · PA
Erik Graf v. Baudissin · RA

PA: Patentanwalt · European Patent Attorney
European Trademark Attorney

RA: Rechtsanwalt · Attorney-at-law · Admitted for
Representation at the EU-Trademark Office (OHIM), Alicante

In cooperation with
Shanghai Zhi Xin Patent Agency Ltd.
Shanghai · China

Patentanmeldung

Identifizierung von Antigen-Epitopen

**Fraunhofer-Gesellschaft
zur Förderung der angewandten Forschung e.V.
Leonrodstraße 54**

80636 MÜNCHEN

Beschreibung

- Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Identifizierung und/oder zum Nachweis von T-Zell-Epitopen eines Protein-Antigens, Verfahren zur Herstellung von Peptid-Impfstoffen gegen ein Protein-Antigen, Verfahren zur Qualitätskontrolle von Rezeptor-Ligand-Komplexen und/oder deren Bestandteilen, Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln mit mindestens einer immobilisierten Rezeptor-Einheit oder einem immobilisierten Rezeptor, Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln mit immobilisierten Peptid-präsentierenden MHC-Molekülen, Verfahren zur Anreicherung und/oder Isolierung spezifischer CD4⁺-T- oder CD8⁺-T-Lymphozyten aus peripheren mononucleären Blutzellen, Verfahren zum Primen und/oder Restimulieren einer CD4⁺-T- oder CD8⁺-T-Lymphozyten-Reaktion in vitro, Nanopartikel mit einer immobilisierten Rezeptor-Einheit, insbesondere einer immobilisierten Kette eines MHC-Moleküls, Nanopartikel mit einem immobilisierten Rezeptor, insbesondere einem immobilisierten MHC-Molekül, Nanopartikel mit einem immobilisierten Peptid-präsentierenden MHC-Rezeptor, einen Peptid-Impfstoff, einen Kit zur Identifizierung und/oder zum Nachweis von T-Zell-Epitopen eines Protein-Antigens, sowie die Verwendung der Nanopartikel zur Identifizierung und/oder zum Nachweis von T-Zell-Epitopen, zur Herstellung von Peptid-Impfstoffen, zur Anreicherung und/oder Isolierung spezifischer T-Lymphozyten sowie zum Primen einer CD4⁺-T- oder CD8⁺-T-Lymphozyten-Reaktion in vitro.
- Die Gesundheit eines tierischen oder menschlichen Organismus hängt unter anderem davon ab, inwieweit der Organismus sich gegen pathogene Agenzien aus seiner Umwelt schützen kann bezie-

5 hungsweise inwieweit der Organismus verändertes körpereigenes
Material erkennen und eliminieren kann. Das Immunsystem des
menschlichen oder tierischen Körpers, das diese Funktionen erfüllt,
lässt sich in zwei funktionelle Bereiche unterteilen, nämlich das an-
geborene und das erworbene Immunsystem. Die angeborene Immu-
nität ist die erste Verteidigungslinie gegen Infektionen und die meis-
ten potentiellen Krankheitserreger werden unschädlich gemacht, be-
vor sie beispielsweise eine erkennbare Infektion verursachen kön-
nen. Das erworbene Immunsystem reagiert auf als Antigene be-
10 zeichnete Oberflächenstrukturen des eindringenden Organismus. Es
gibt zwei Typen erworbener Immunreaktionen, nämlich die humorale
Immunreaktion und die zellvermittelte Immunreaktion. Bei der humo-
ralen Immunreaktion binden in den Körperflüssigkeiten vorhandene
Antikörper an Antigene und zerstören diese. Bei der zellvermittelten
15 Immunreaktion werden T-Zellen aktiv, die andere Zellen zerstören
können. Wenn beispielsweise mit einer Krankheit im Zusammen-
hang stehende Proteine in einer Zelle vorhanden sind, werden sie
innerhalb der Zelle proteolytisch zu Peptiden fragmentiert. Danach
binden spezifische Zellproteine an die so entstandenen Fragmente
20 des Proteins oder Antigens und transportieren diese an die Oberflä-
che der Zelle, wo sie den molekularen Abwehrmechanismen, insbe-
sondere T-Zellen des Körpers präsentiert werden.

Die Moleküle, die die Peptide an die Zelloberfläche transportieren
und dort präsentieren, werden als Proteine des Haupthistokompatibi-
25 litäts-Komplexes (MHC) bezeichnet. Die Bedeutung der MHC-
Proteine besteht insbesondere darin, dass sie T-Zellen ermöglichen,
„selbst“ (self)-Antigene von „nicht selbst“ (non-self)-Antigenen zu un-
terscheiden. Die MHC-Proteine werden in MHC-Proteine der Klasse I
und der Klasse II unterteilt. Obwohl die Proteine der beiden MHC-

Klassen strukturell sehr ähnlich sind, unterscheidet sich ihre Funktion relativ deutlich. Proteine der MHC-Klasse I sind auf der Oberfläche fast aller Körperzellen vorhanden. Die Proteine der MHC-Klasse I präsentieren Antigene, die normalerweise von körpereigenen Proteinen stammen, gegenüber cytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs). Die MHC-Proteine der Klasse II sind nur auf B-Lymphozyten, Makrophagen und anderen Antigen-präsentierenden Zellen vorhanden. Sie präsentieren hauptsächlich Peptide, die aus externen, also nicht körpereigenen Antigen-Quellen stammen, gegenüber T-Helfer (Th)-Zellen.

MHC-Moleküle der Klasse I werden konstitutiv auf der Oberfläche fast aller Zelltypen innerhalb des Körpers gebildet. Die von den MHC-Proteinen der Klasse I gebundenen Peptide stammen von normalerweise im gesunden Wirtsorganismus selbst produzierten zytoplasmatischen Proteinen ab, die weder im Zusammenhang mit Fremdzellen noch entarteten Zellen stehen. Normalerweise wird durch solche MHC-Proteine der Klasse I auch keine Immunreaktion stimuliert. Zytotoxische T-Lymphozyten, die solche „self“ (selbst)-Peptide präsentierende MHC-Moleküle der Klasse I erkennen, werden daher in den Thymus transportiert oder nach ihrer Freisetzung aus dem Thymus vom Körper toleriert. MHC-Moleküle können nur dann eine Immunreaktion stimulieren, wenn ein „non-self“ (nicht-selbst)-Peptid gebunden ist, an das zytotoxische T-Lymphozyten binden. Die meisten zytotoxischen T-Lymphozyten besitzen sowohl T-Zell-Rezeptoren (TCR) und CD8-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Die T-Zell-Rezeptoren können nur dann non-self-Peptide erkennen und daran binden, wenn sie in Form eines Komplexes mit den Molekülen der MHC-Klasse I vorliegen. Damit ein T-Zell-Rezeptor einen Peptid-MHC-Komplex binden kann, müssen zwei Bedingungen erfüllt

sein. Erstens müssen die T-Zell-Rezeptoren eine Struktur aufweisen, die ihnen eine Bindung an den Peptid-MHC-Komplex erlaubt. Zweitens muss das CD8-Molekül an die α -3-Domäne der MHC-Klasse I-Moleküle binden. Jeder zytotoxische T-Lymphozyt exprimiert einen
5 unikalenen T-Zell-Rezeptor, der nur einen spezifischen MHC-Peptid-Komplex binden kann.

Die Peptide binden an die Moleküle der MHC-Klasse I durch kompetitive Affinitätsbindung innerhalb des endoplasmatischen Retikulums, bevor sie auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Die Affinität eines einzelnen Peptides steht dabei in direktem Zusammenhang mit
10 seiner Aminosäuresequenz und dem Vorhandensein von spezifischen Bindungsmotiven an definierten Positionen innerhalb der Aminosäuresequenz. Die Kenntnis der Sequenz eines solchen „non-self“-Peptides ermöglicht es beispielsweise, das Immunsystem gegen erkrankte Zellen zu manipulieren, zum Beispiel unter Verwendung von Peptid-Impfstoffen. Die direkte Analyse von solchen „non-self“-Peptiden wird jedoch durch mehrere Faktoren erschwert. Beispielsweise sind sehr häufig relevante Epitope, d.h. relevante Peptidsequenzen unterrepräsentiert. Erschwerend kommt hinzu, dass
15 MHC-Moleküle einen hohen Polymorphismus-Grad aufweisen. So kann ein Individuum allein bei den Molekülen der MHC-Klasse I bis zu sechs verschiedene Polymorphismen aufweisen, wobei in jedem Fall zum Teil sehr unterschiedliche Peptidsequenzen gebunden werden.
20

25 Unter Verwendung von Computeralgorithmen lassen sich potentielle T-Zell-Epitope, also Peptidsequenzen, die von den MHC-Molekülen der Klasse I oder II in Form eines Peptid-präsentierenden Komplexes gebunden und dann in dieser Form von den T-Zell-Rezeptoren

zytotoxischer T-Lymphozyten erkannt werden, vorhersagen. Das heißt, das Ergebnis solcher Analysen erlaubt Aussagen über die Wahrscheinlichkeit einer Bindung eines Peptides an spezifische MHC-Moleküle, beispielsweise HLA-Phänotypen. Derzeit werden insbesondere zwei Programme, nämlich SYFPEITHI (Rammensee et al., Immunogenetics, 50 (1999), 213-219) und HLA_BIND (Parker et al., J. Immunol., 152 (1994), 163-175) verwendet. Die so ermittelten Peptidsequenzen, die potentiell mit MHC-Molekülen der Klasse I eine Bindung eingehen können, müssen dann in vitro hinsichtlich ihrer tatsächlichen Bindungskapazität untersucht werden. Die dazu erforderlichen Verfahren sind jedoch in ihrer Wirksamkeit stark beschränkt, da nur eine äußerst geringe Anzahl von Peptiden simultan gescreent und untersucht werden kann.

Das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende technische Problem besteht darin, ein verbessertes Verfahren zum Screenen potentieller T-Zell-Epitope bereitzustellen, das eine simultane und schnelle Untersuchung einer Vielzahl von Peptidsequenzen, beispielsweise solcher Sequenzen, die unter Verwendung von Computeralgorithmen bereits als potentielle Bindungspartner für spezifische MHC-Moleküle ermittelt wurden, hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Bindung an spezifische MHC-Moleküle erlaubt.

Die vorliegende Erfindung löst das ihr zugrunde liegende technische Problem durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Identifizierung und/oder zum Nachweis von T-Zell-Epitopen eines Protein-Antigens in vitro, wobei eine Population von Peptid-Fragmenten des Antigens einer kompetitiven Bindung an eine erste immobilisierte Rezeptor-Einheit, vorzugsweise und optional in Gegenwart einer zweiten Rezeptor-Einheit, die zusammen mit der ersten Rezeptor-Einheit einen

Rezeptor bilden kann, unterworfen und das oder die gebundenen Peptid-Fragmente mit Affinität zu dem Rezeptor an zumindest die erste Rezeptor-Einheit, vorzugsweise an die beiden Rezeptor-Einheiten bindet, und das oder die gebundene(n) Peptid-Fragmente anschließend isoliert und analysiert wird beziehungsweise werden, umfassend

5

a) Immobilisierung mindestens der ersten Rezeptor-Einheit, die mindestens eine erste funktionelle Gruppe aufweist, an einem Nanopartikel, dessen Oberfläche mindestens eine die erste funktionelle Gruppe bindende zweite funktionelle Gruppe aufweist,

10

b) Herstellung beziehungsweise Bereitstellung einer Population von Peptid-Fragmenten des Protein-Antigens, die unterschiedliche Sequenzbereiche des Protein-Antigens umfassen,

c) Durchführung einer kompetitiven Bindung der Peptidfragment-Population an die am Nanopartikel immobilisierte erste Rezeptor-Einheit, optional, insbesondere bei MHC-Molekülen der Klasse II, in Gegenwart einer zweiten Rezeptor-Einheit, wobei das oder die Peptid-Fragmente mit Affinität zu der ersten beziehungsweise beiden Rezeptor-Einheiten, insbesondere, wenn vorhanden, zusammen mit der zweiten Rezeptor-Einheit, an die erste Rezeptor-Einheit bindet und ein an dem Nanopartikel immobilisierter Rezeptor-Peptidfragment-Komplex erhalten wird, und

15

20

d) Analyse des immobilisierten Rezeptor-Peptidfragment-Komplex und/oder des beziehungsweise der gebundenen Peptid-Fragmente(s).

25

Die vorliegende Erfindung löst das ihr zugrunde liegende technische Problem also durch die Bereitstellung eines Verfahrens, wobei in vitro ein Rezeptor/Ligand-Komplex, insbesondere ein Rezeptor-Peptidfragment-Komplex unter Bedingungen erzeugt wird, die den tatsächlichen in vivo-Verhältnisse, beispielsweise in einer Zelle mit MHC-Molekülen der Klasse I weitestgehend entsprechen. Dabei wird erfindungsgemäß eine Population von Peptidfragmenten, die beispielsweise die vollständige Aminosäuresequenz eines Protein-Antigens repräsentieren können, erzeugt und die gesamte Peptidfragment-Population wird dann in einem Schritt einer Bindung an einen immobilisierten Rezeptor, insbesondere einen MHC-Komplex, oder an eine immobilisierte Rezeptor-Einheit, also eine Kette des MHC-Komplexes unterworfen. In Fällen, in denen der Rezeptor ein Protein der MHC-Klasse I ist, kann die Bindung des oder der Peptidfragmente an die immobilisierte erste Rezeptor-Einheit, insbesondere die α -Kette, für die erfindungsgemäße Identifizierung ausreichen, ohne dass eine zweite Rezeptor-Einheit vorhanden sein muss. Selbstverständlich kann diese zweite Einheit dennoch vorhanden sein. Dies gilt insbesondere für den Fall, dass der Rezeptor ein Protein der MHC-Klasse II ist. Das oder die Peptid-Fragmente, die Affinität zu dem Rezeptor, der einen Rezeptor-Einheit und/oder den beiden Rezeptor-Einheiten aufweist beziehungsweise aufweisen, kann dann tatsächlich einen in immobilisierter Form vorliegenden Rezeptor-Ligand-Komplex oder einen Rezeptor-Peptidfragment-Komplex bilden. Da erfindungsgemäß die Immobilisierung an Nanopartikeln erfolgt, kann der resultierende Rezeptor-Ligand-Komplex auf einfache Weise von den Peptid-Fragmenten abgetrennt werden, die keinen Rezeptor-Ligand-Komplex bilden können, also keine Affinität zu dem ersten oder beiden Rezeptor-Einheiten aufweisen, da sie also

im Vergleich zu dem im Komplex gebundenen Peptid-Fragment keine oder eine erheblich geringere Affinität zu dem Rezeptor aufweisen. Erfindungsgemäß kann das Peptid-Fragment oder die Peptid-Fragmente mit Affinität aus der Population von Peptid-Fragmenten abgetrennt und analysiert werden. Dieses Peptid-Fragment kann erfindungsgemäß in gebundener Form, d.h. als Rezeptor-Ligand-Komplex beispielsweise unter Verwendung von MALDI-Massenspektrometrie analysiert werden. Das im Komplex gebundene Peptid-Fragment kann jedoch erfindungsgemäß auch von dem immobilisierten Komplex abgetrennt und separat analysiert werden, beispielsweise einer Sequenzierung unterworfen werden. Die für die erfindungsgemäße Verfahrensweise bereitgestellte Peptid-Fragment-Population enthält die einzelnen, individuellen Peptid-Fragmente jeweils in ausreichender Menge, um eine erfindungsgemäße Identifizierung zu ermöglichen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem „T-Zell-Epitop“ eine Peptidsequenz verstanden, die von den MHC-Molekülen der Klasse I oder II in Form eines Peptid-präsentierenden MHC-Moleküls oder MHC-Komplexes gebunden und dann in dieser Form von zytotoxischen T-Lymphozyten oder T-Helfer-Zellen erkannt und gebunden werden kann.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem „Rezeptor“ ein biologisches Molekül oder eine Molekülgruppierung verstanden, das/die einen Liganden binden kann. Ein Rezeptor kann zum Beispiel der Informationsübermittlung in einer Zelle, einem Zellverband oder einem Organismus dienen. Der Rezeptor besteht aus mindestens einer Rezeptor-Einheit und vorzugsweise aus zwei Rezeptor-Einheiten, wobei jede Rezeptor-Einheit aus einem Proteinmo-

lekül, insbesondere einem Glykoproteinmolekül bestehen kann. Der Rezeptor weist zu einem Liganden eine komplementäre Struktur auf und kann den Liganden als Bindungspartner komplexieren. Die Informationsweiterleitung erfolgt insbesondere durch Änderung der Konformation des Rezeptors nach Komplexierung des Liganden an der Oberfläche einer Zelle. Erfindungsgemäß werden unter einem Rezeptor insbesondere Proteine der MHC-Klassen I und II verstanden, die mit einem Liganden, insbesondere einem Peptid oder Peptidfragment geeigneter Länge, einen Rezeptor-Ligand-Komplex bilden können.

Unter einem „Liganden“ wird ein Molekül verstanden, das zu einem Rezeptor eine komplementäre Struktur aufweist und mit diesem einen Komplex bilden kann. Erfindungsgemäß wird unter einem Liganden insbesondere ein Peptid oder Peptid-Fragment verstanden, das eine geeignete Länge und in seiner Aminosäuresequenz geeignete Bindungsmotive aufweist, so dass das Peptid oder Peptid-Fragment mit Proteinen der MHC-Klasse I oder der MHC-Klasse II einen Komplex bilden kann.

Unter einem „Rezeptor-Ligand-Komplex“ wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung auch ein „Rezeptor-Peptid-Komplex“ oder „Rezeptor-Peptidfragment-Komplex“, insbesondere ein Peptid- oder Peptidfragment-präsentierendes MHC-Molekül der Klasse I oder der Klasse II verstanden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter „Proteinen oder Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC)“, „MHC-Molekülen“ oder „MHC-Proteinen“ insbesondere Proteine verstanden, die Peptide, die aus der proteolytischen Spaltung

von Protein-Antigenen resultieren und potentielle T-Zell-Epitope darstellen, binden, an die Zelloberfläche transportieren und dort gegenüber spezifischen Zellen, insbesondere zytotoxischen T-Lymphozyten oder T-Helfer-Zellen präsentieren können. Der
5 Haupthistokompatibilitätskomplex im Genom umfasst die genetische Region, deren exprimierte Genprodukte auf der Zelloberfläche wichtig für die Erkennung körpereigener und/oder körperfremder Antigene und damit für die Regulation immunologischer Vorgänge sind. Der Haupthistokompatibilitätskomplex wird in zwei Gengruppen
10 geteilt, die unterschiedliche Proteine codieren, nämlich Moleküle der MHC-Klasse I und Moleküle der MHC-Klasse II. Die Moleküle der beiden MHC-Klassen sind auf unterschiedliche Antigen-Quellen spezialisiert. Die Moleküle der MHC-Klasse I präsentieren endogen synthetisierte Antigene, beispielsweise virale Proteine. Die Moleküle der
15 MHC-Klasse II präsentieren aus exogenen Quellen stammende Protein-Antigene, beispielsweise bakterielle Produkte. Die Zellbiologie und die Expressionsmuster beider MHC-Klassen sind auf diese unterschiedlichen Rollen ausgerichtet.

MHC-Moleküle der Klasse I bestehen aus einer schweren Kette von
20 etwa von etwa 45 kDa und einer leichten Kette von etwa 12 kDa und können ein Peptid von etwa 8 bis 10 Aminosäuren, sofern dieses über geeignete Bindungsmotive verfügt, binden und gegenüber zytotoxischen T-Lymphozyten präsentieren. Das von den MHC-Molekülen der Klasse I gebundene Peptid stammt von einem endo-
25 genen Protein-Antigen. Bei der schweren Kette der MHC-Moleküle der Klasse I handelt es sich vorzugsweise um ein HLA-A-, HLA-B- oder HLA-C-Monomer und bei der leichten Kette um β -2-Mikroglobulin.

5 MHC-Moleküle der Klasse II bestehen aus einer α -Kette von etwa 34 kDa und einer β -Kette von etwa 30 kDa und können ein Peptid von etwa 15 bis 24 Aminosäuren binden, sofern dieses über geeignete Bindungsmotive verfügt, und gegenüber T-Helfer-zellen präsentieren. Das von den MHC-Molekülen der Klasse II gebundene Peptid stammt von einem exogenen Protein-Antigen. Bei der α -Kette und der β -Kette handelt es sich insbesondere um HLA-DR-, HLA-DQ- und HLA-DP-Monomere.

10 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem „Nanopartikel“ eine partikuläre Bindematrix verstanden, die an ihrer Oberfläche mindestens erste funktionelle chemische Gruppen umfassende molekülspezifische Erkennungsstellen aufweist. Die erfindungsgemäß verwendeten Nanopartikel umfassen einen Kern mit einer Oberfläche, auf der die ersten funktionellen Gruppen angeordnet sind, wobei die ersten funktionellen Gruppen komplementäre
15 zweite funktionelle Gruppen eines Moleküls kovalent oder nicht-kovalent binden können. Durch Wechselwirkung zwischen den ersten und zweiten funktionellen Gruppen wird das Molekül, vorzugsweise Biomolekül, an dem Nanopartikel immobilisiert und/oder kann
20 daran immobilisiert werden. Die erfindungsgemäß verwendeten Nanopartikel weisen eine Größe von < 500 nm, vorzugsweise < 150 nm auf. Der Kern der Nanopartikel besteht vorzugsweise aus chemisch inerten anorganischen oder organischen Materialien, besonders bevorzugt aus Silica.

25 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer „ersten funktionellen Gruppe“ eine in einer Rezeptor-Einheit, insbesondere einer Kette eines MHC-Moleküls, vorhandene chemische Gruppe verstanden, die in der Lage ist, mit einer komplementären

funktionellen Gruppe, die beispielsweise auf der Oberfläche des Nanopartikels vorhanden ist, derart zu interagieren, dass eine affine, bevorzugt kovalente Bindung zwischen den beiden Bindungspartnern stattfinden kann. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die

5 erste funktionelle Gruppe ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Carboxy-Gruppen, Amino-Gruppen, Thiol-Gruppen, Biotin-Gruppen, His-Tag, FLAG-Tag, Strep-Tag I-Gruppen, Strep-Tag II-Gruppen, Histidin-Tag-Gruppen und FLAG-Tag-Gruppen.

Die zweite funktionelle Gruppe, also die funktionelle Gruppe auf der

10 Oberfläche des Nanopartikels, ist erfindungsgemäß ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Amino-Gruppen, Carboxy-Gruppen, Maleinimido-Gruppen, Avidin-Gruppen, Streptavidin-Gruppen, Neutravidin-Gruppen und Metallchelatkomplexen.

Ein erfindungsgemäß verwendetes Nanopartikel weist also an seiner

15 Oberfläche mindestens eine zweite funktionelle Gruppe auf, die kovalent oder nicht-kovalent mit einer ersten funktionellen Gruppe einer Rezeptor-Einheit verknüpft wird, wobei die erste funktionelle Gruppe eine andere Gruppe als die zweite funktionelle Gruppe ist. Die beiden miteinander in Bindung tretenden Gruppen müssen komplementär zueinander sein, das heißt fähig sein, eine kovalente oder nicht-

20 kovalente Bindung miteinander einzugehen.

Wird erfindungsgemäß als erste funktionelle Gruppe beispielsweise eine Carboxy-Gruppe eingesetzt, so ist die zweite funktionelle Gruppe auf der Oberfläche der Nanopartikel eine Amino-Gruppe. Wird

25 erfindungsgemäß umgekehrt eine Amino-Gruppe als erste funktionelle Gruppe der Rezeptor-Einheit verwendet, ist erfindungsgemäß die zweite funktionelle Gruppe auf der Nanopartikel-Oberfläche eine

Carboxy-Gruppe. Wird erfindungsgemäß eine Thiol-Gruppe als erste funktionelle Gruppe der Rezeptor-Einheit ausgewählt, ist die zweite funktionelle Gruppe erfindungsgemäß eine Maleinimido-Gruppe. Werden erfindungsgemäß als erste funktionelle Gruppen der Rezeptor-Einheit Biotin-Gruppen und/oder Strep-Tag I-Gruppen und/oder Strep-Tag II-Gruppen verwendet, ist die zweite funktionelle Gruppe auf der Nanopartikel-Oberfläche eine Avidin-Gruppe und/oder eine Streptavidin-Gruppe oder eine Neutravidin-Gruppe. Wird erfindungsgemäß als erste funktionelle Gruppe der Rezeptor-Einheit eine Thiol-Gruppe eingesetzt, ist die zweite funktionelle Gruppe auf der Nanopartikel-Oberfläche eine Maleinimido-Gruppe.

Die vorgenannten ersten und/oder zweiten funktionellen Gruppen können mit Hilfe eines Spacers mit der zu immobilisierenden Rezeptor-Einheit beziehungsweise der Oberfläche der Nanopartikel verbunden beziehungsweise mittels eines Spacers an die Nanopartikeloberfläche oder in die Rezeptor-Einheit eingeführt werden. Der Spacer dient also einerseits als Abstandshalter der funktionellen Gruppe zur Nanopartikel-Oberfläche beziehungsweise Rezeptor-Einheit, andererseits als Träger für die funktionelle Gruppe. Ein derartiger Spacer kann erfindungsgemäß Alkylen-Gruppen oder Ethylenoxid-Oligomere mit 2 bis 50 C-Atomen sein, der in bevorzugter Ausführungsform substituiert ist und Heteroatome aufweist. Der Spacer kann flexibel und/oder linear sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass die ersten funktionellen Gruppen ein natürlicher Bestandteil der Rezeptor-Einheit sind. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, die ersten funktionellen Gruppen mittels gentechnischer Verfahren, biochemischer, enzymatischer

- und/oder chemischer Derivatisierung oder chemischer Syntheseverfahren in die Rezeptoreinheit einzuführen. Beispielsweise können unnatürliche Aminosäuren durch gentechnische Verfahren oder während einer chemischen Proteinsynthese in die Rezeptor-Einheit eingefügt werden, beispielsweise zusammen mit Spacern oder Linkern. Derartige unnatürliche Aminosäuren sind Verbindungen, die eine Aminosäurefunktion und einen Rest R aufweisen und nicht über den natürlich vorkommenden genetischen Code definiert sind, wobei diese Aminosäuren in bevorzugter Weise eine Thiol-Gruppe aufweisen.
- 5 Erfindungsgemäß kann auch vorgesehen sein, eine natürlicherweise vorkommende Aminosäure, beispielsweise Lysin, zu modifizieren, beispielsweise durch Derivatisierung ihrer Seitenkette, insbesondere deren primäre Amino-Gruppe mit der Carbonsäurefunktion von Lävulinensäure.
- 10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können funktionelle Gruppen durch Modifikation in die Rezeptor-Einheit eingeführt werden, wobei der Rezeptor-Einheit Tags, also Markierungen, hinzugefügt werden, vorzugsweise an den C-Terminus oder den N-Terminus. Diese Tags können jedoch auch
- 15 intramolekular angeordnet sein. Insbesondere ist vorgesehen, dass ein Protein-Rezeptor dadurch modifiziert wird, dass mindestens ein Strep-Tag, beispielsweise ein Strep-Tag I oder Strep-Tag II oder Biotin, zum Beispiel über BirA, hinzugefügt wird. Erfindungsgemäß werden unter einem Strep-Tag auch funktionelle und/oder strukturelle
- 20 Äquivalente verstanden, sofern sie Streptavidin-Gruppen und/oder dessen Äquivalente binden können. Der Begriff „Streptavidin“ erfasst erfindungsgemäß also auch dessen funktionelle und/oder strukturelle
- 25 Äquivalente.

Die Oberfläche des Nanopartikels ist erfindungsgemäß dadurch charakterisiert, dass sie durch Aufbringen der die ersten funktionellen Gruppen bindenden komplementären zweiten funktionellen Gruppen modifiziert ist. Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass

5 die funktionellen Gruppen unter Verwendung von Standardverfahren wie Pfropf-Polymerisation, Silanisierung, chemischer Derivatisierung und ähnlicher geeigneter Verfahren auf die Nanopartikel-Oberfläche aufgebracht sind.

In einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen,

10 dass die Nanopartikel-Oberfläche durch Aufbringen zusätzlicher Funktionalitäten modifiziert sein kann.

In bevorzugter Ausführungsform kann die Oberfläche der Nanopartikel chemische Verbindungen aufweisen, die eine unspezifische Adsorption von anderen Proteinen an den Nanopartikeln verhindern

15 oder verringern. Besonders bevorzugt weist die Oberfläche Ethylen-glykol-Oligomere auf.

Erfindungsgemäß besteht auch die Möglichkeit, dass auf der Oberfläche der Nanopartikel separat oder zusätzlich Ionenaustausch-Funktionen verankert sind. Dies gilt insbesondere für den Fall, dass

20 die Analyse des erhaltenen Rezeptor-Ligand-Komplexes, insbesondere des Peptid-präsentierenden MHC-Moleküls und/oder des darin gebundenen Peptid-Fragmentes unter Verwendung von MALDI-Verfahren analysiert werden soll. In der MALDI-Analytik ist der Salz-Gehalt der Matrix oft eine kritische Größe, da es durch Ionenanlage-

25 rung zu einer Unterdrückung der Ionisation oder zu einer Peak-Verbreiterung kommt beziehungsweise dass sich auch Störpeaks ergeben. Mit Nanopartikeln, die eine hohe Ionenaustausch-Kapazität

besitzen und dadurch störende Salze in der Matrix fixieren, lässt sich dieses Problem umgehen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifizierung und/oder zum Nachweis von T-Zell-Epitopen ist vorgesehen, dass die bevorzugt vorhandene zweite Rezeptor-Einheit vor Durchführung der kompetitiven Bindungsreaktion frei in Lösung vorliegt, insbesondere bei MHC I-Molekülen β -2-Mikroglobulin. Das heißt, in dieser bevorzugten Ausführungsform, in der eine zweite Rezeptor-Einheit eingesetzt wird, enthält der zur Durchführung der erfindungsgemäßen kompetitiven Bindungsreaktion verwendete Puffer sowohl die zweite Rezeptor-Einheit als auch die Population der Peptidfragmente des Protein-Antigens. Die Nanopartikel mit der immobilisierten ersten Rezeptor-Einheit, wobei die Immobilisierung durch Bindung der ersten funktionellen Gruppe der ersten Rezeptor-Einheit an die zweite funktionelle Gruppe an der Nanopartikel-Oberfläche erfolgt, werden dann zu dem die zweite Rezeptor-Einheit und die Peptidfragment-Population enthaltenden Puffer gegeben und in diesem inkubiert, wobei die erste Rezeptor-Einheit, die zweite Rezeptor-Einheit und das mindestens eine Peptidfragment mit Affinität zu den beiden Rezeptor-Einheiten beziehungsweise dem durch die beiden Rezeptor-Einheiten gebildeten Rezeptor oder Rezeptor-Dimer einen Rezeptor-Ligand-Komplex, insbesondere ein Peptid-präsentierendes MHC-Molekül bilden können. Der gebildete Rezeptor-Ligand-Komplex ist dabei über die immobilisierte erste Rezeptor-Einheit an den Nanopartikeln immobilisiert.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifizierung und/oder zum Nachweis von T-Zell-Epitopen ist vorgesehen, dass die zweite Rezeptor-Einheit zu-

sammen mit der ersten Rezeptor-Einheit vor Durchführung der kompetitiven Bindungsreaktion in Form eines den Rezeptor, insbesondere ein MHC-Molekül, bildenden Dimers an den Nanopartikeln immobilisiert wird. In dieser Ausführungsform ist vorgesehen, dass die

5 zweite Rezeptor-Einheit mindestens eine dritte funktionelle Gruppe aufweist und die Oberfläche des Nanopartikels mindestens eine komplementäre, die dritte funktionelle Gruppe bindende vierte funktionelle Gruppe aufweist. Vorzugsweise werden beide Rezeptoreinheiten, die das Rezeptor-Dimer bilden, gerichtet und unter Beibehaltung der biologischen Aktivität des Rezeptors an dem Nanopartikel

10 immobilisiert.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Begriff „gerichtet immobilisiert“ oder „gerichtete Immobilisierung“, dass ein Molekül, insbesondere das Rezeptor-Dimer an definierten

15 Positionen innerhalb der beiden Rezeptor-Einheiten dergestalt an einem Nanopartikel immobilisiert ist, dass die dreidimensionale Struktur der für die biologische Aktivität erforderlichen Domäne(n) des Rezeptors gegenüber dem nicht-immobilisierten Zustand nicht verändert ist und dass diese Rezeptor-Domäne(n), insbesondere die

20 Bindungstasche zur Bindung eines geeigneten Peptides, bei Kontakt mit geeigneten Peptiden für diese frei zugänglich ist/sind. „Gerichtet immobilisiert“ bedeutet auch, dass die Fixierung der beiden Rezeptor-Einheiten, die das Rezeptor-Dimer bilden, so erfolgt, dass der immobilisierte Rezeptor bei einer späteren Verwendung in einer zellulären beziehungsweise zellähnlichen Umgebung durch Protein-

25 degradierende Enzyme nicht oder nur sehr langsam degradiert werden kann. Das heißt, dass das immobilisierte Rezeptor-Dimer auf der Oberfläche der Nanopartikel so ausgerichtet ist, dass es so wenig wie möglich Angriffspunkte für Proteasen bietet.

- „Beibehaltung der biologischen Aktivität“ bedeutet, dass die den Rezeptor bildenden Rezeptor-Einheiten nach Immobilisierung an der Oberfläche eines Nanopartikels die gleichen oder nahezu gleichen biologischen Funktionen in zumindest ähnlichem Ausmaß ausüben können wie die gleichen Rezeptor-Einheiten oder der durch beide Einheiten gebildete Rezeptor im nicht-immobilisierten Zustand unter geeigneten in vitro-Bedingungen beziehungsweise die gleichen Rezeptor-Einheiten oder der gleiche Rezeptor in ihrer/seiner natürlichen zellulären Umgebung.
- 5
- 10 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem „Dimer“ oder „Rezeptor-Dimer“ eine Verbindung verstanden, die durch Verknüpfung von zwei Untereinheiten oder Einheiten gebildet wird. Bei den zwei verknüpften Rezeptor-Untereinheiten handelt es sich um unterschiedliche Moleküle, die sich sowohl bezüglich ihrer Zusammensetzung, das heißt Aminosäuresequenz, als auch bezüglich ihrer Länge unterscheiden können. Vorzugsweise ist bei dem immobilisierten Rezeptor-Dimer jede Rezeptor-Untereinheit oder Rezeptor-Einheit an der Oberfläche des Nanopartikels gebunden. Erfindungsgemäß ist auch vorgesehen, dass nur eine Rezeptor-Einheit
- 15
- 20 des Rezeptor-Dimers über eine kovalente Bindung zwischen der ersten funktionellen Gruppe und der zweiten funktionellen Gruppe am Nanopartikel fixiert ist.

Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die dritte funktionelle Gruppe der zweiten Rezeptor-Einheit von der ersten funktionellen Gruppe der ersten Rezeptor-Einheit verschieden ist und ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Carboxy-Gruppen, Amino-Gruppen, Thiol-Gruppen, Biotin-Gruppen, His-Tag, FLAG-Tag, Strep-Tag I-Gruppen, Strep-Tag II-Gruppen, Histidin-Tag-Gruppen und FLAG-

25

Tag-Gruppen. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die dritte funktionelle Gruppe ein natürlicher Bestandteil der zweiten Rezeptor-Einheit oder mittels gentechnischer Verfahren, enzymatischer Verfahren und/oder chemischer Derivatisierung in die zweite Rezeptor-

5 Einheit eingeführt wird.

Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die vierte funktionelle Gruppe auf der Nanopartikel-Oberfläche von der die erste funktionelle Gruppe bindenden zweiten funktionellen Gruppe der Nanopartikel verschieden ist. Die vierte funktionelle Gruppe, also die funktionelle

10 Gruppe auf der Oberfläche des Nanopartikels, ist erfindungsgemäß ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Amino-Gruppen, Carboxy-Gruppen, Maleinimido-Gruppen, Avidin-Gruppen, Streptavidin-Gruppen, Neutravidin-Gruppen und Metallchelatkomplexen. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die vierte funktionelle Gruppe e-

15 benso wie die zweite funktionelle Gruppe mittels Propfsilanisierung, Silanisierung, chemischer Derivatisierung oder ähnlicher geeigneter Verfahren auf die Nanopartikel-Oberfläche aufgebracht wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass die erste und zweite Rezeptor-Einheit natürlicherweise vorkommende oder mittels gentechnischer Verfahren oder chemischer Syntheseverfahren hergestellte Moleküle, insbesondere Ketten eines MHC-Moleküls, sind.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Rezeptor ein MHC-Molekül der Klasse I. Erfindungsgemäß bevorzugt handelt es sich bei der ersten Rezeptor-Einheit um eine schwere Kette von etwa 45 kDa und der zweiten Rezeptor-Einheit um eine leichte Kette von etwa 12 kDa oder bei der ersten Rezeptor-Einheit um eine

25

- leichte Kette von etwa 12 kDa und der zweiten Rezeptor-Einheit um eine schwere Kette von etwa 45 kDa. Selbstverständlich können auch Modifikationen, Mutationen oder Varianten dieser Ketten eingesetzt werden, zum Beispiel verkürzte Formen dieser Ketten, zum
- 5 Beispiel solche, denen die Transmembranregion fehlt. Derartige truncierte Formen können zum Beispiel schwere Ketten ohne Transmembranregion mit einem Molekulargewicht von 35 kDa sein. Wenn also erfindungsgemäß die erste und die zweite Rezeptor-Einheit einen MHC-Komplex der Klasse I bilden können, können sie
- 10 ein Peptid-Fragment von etwa 8 bis 18, vorzugsweise etwa 8 bis 10 Aminosäuren in der kompetitiven Bindungsreaktion binden und so ein Peptid-präsentierender Rezeptor bilden. Vorzugsweise handelt es sich bei der schweren Kette um ein HLA-A-, HLA-B- oder HLA-C-Monomer und bei der leichten Kette um β -2-Microglobulin.
- 15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Rezeptor ein MHC-Molekül der Klasse II. Erfindungsgemäß bevorzugt handelt es sich bei der ersten Rezeptor-Einheit um eine α -Kette von etwa 34 kD und bei der zweiten Rezeptor-Einheit um eine β -Kette von etwa 30 kD oder bei der ersten Rezeptor-Einheit um eine
- 20 β -Kette von etwa 30 kD und der zweiten Rezeptor-Einheit um eine α -Kette von etwa 34 kD. Vorzugsweise handelt es sich bei der α -Kette und der β -Kette um HLA-DR-, HLA-DQ- oder HLA-DP-Monomere. Erfindungsgemäß können auch Mutationen, Modifikationen oder Varianten davon eingesetzt werden. Erfindungsgemäß ist vorgesehen,
- 25 dass bei Verwendung der α -Kette und der β -Kette das zu analysierende Peptid-Fragment von einem exogenen Protein-Antigen abstammt. Wenn also erfindungsgemäß die erste und die zweite Rezeptor-Einheit einen MHC-Komplex der Klasse II bilden, können sie ein Peptid-Fragment von etwa 8 bis 18, vorzugsweise etwa 8 bis 10

Aminosäuren in der kompetitiven Bindungsreaktion binden und so ein Peptid-präsentierender Rezeptor bilden. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die erste und die zweite Rezeptor-Einheit natürlicherweise vorkommende oder mittels gentechnischer Verfahren oder chemischer Syntheseverfahren hergestellte Ketten sind.

Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die Population von Peptid-Fragmenten des zu analysierenden Protein-Antigens mittels enzymatischer Protein-Spaltung, gentechnischer Verfahren oder chemischer Syntheseverfahren hergestellt wird.

10 In einer ersten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass die so erhaltenen Peptid-Fragmente der hergestellten Population die gesamte Aminosäuresequenz des Proteins-Antigens vollständig repräsentieren. In einer zweiten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass die Peptidfragmente der Population die Aminosäuresequenz des Protein-Antigens nur teilweise repräsentieren. Dabei handelt es sich insbesondere um Peptid-Fragmente, die, wie mittels eines Computer-Algorithmus bestimmt, potentielle T-Zell-Epitope darstellen. Erfindungsgemäß können zur Vorhersage potentieller T-Zell-Epitope Computer-Algorithmen wie SYFPEETHI (Rammensee et al., 1999) und HLA_BIND (Parker et al., 1994) eingesetzt werden. Wenn es sich bei dem Rezeptor um ein MHC-Molekül vom Typ I handelt, ist vorgesehen, dass die Peptid-Fragmente der herzustellenden Population eine Länge von 8 bis 10 Aminosäuren aufweisen. Handelt es sich hingegen bei dem Rezeptor um ein MHC-Molekül vom Typ II, weisen die Peptid-Fragmente der herzustellenden Population vorzugsweise eine Länge von 15 bis 24 Aminosäuren auf.

Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die Peptid-Fragmente der Population mit einem Marker und/oder einer fünften funktionellen Gruppe versehen werden. Der Marker dient insbesondere zum Nachweis der Peptid-Fragmente. Bei dem Marker kann es sich beispielsweise um einen Fluoreszenzmarker oder einen radioaktiven Marker handeln. Die fünfte funktionelle Gruppe der Peptid-Fragmente dient vorzugsweise zur Isolierung und/oder Aufreinigung der Peptidfragmente. Beispielsweise kann das im Peptid-präsentierenden MHC-Molekül gebundene Peptid-Fragment nach Freisetzung aus dem Komplex durch Bindung der fünften funktionellen Gruppe an komplementäre sechste funktionelle Gruppen an geeignete Nanopartikel immobilisiert und so von den übrigen Bestandteilen des Komplexes abgetrennt werden. Die fünfte funktionelle Gruppe ist vorzugsweise von der ersten, zweiten, dritten und/oder vierten funktionellen Gruppe verschieden und kann mit diesen keine Bindung eingehen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Immobilisierung der ersten Rezeptor-Einheit oder die Immobilisierung der ersten und zweiten Rezeptor-Einheit an die Nanopartikel durch eine Inkubation der Rezeptor-Einheit(en) mit den Nanopartikeln in einen PBS-Puffer über einen Zeitraum von einer Stunde bis vier Stunden, vorzugsweise zwei Stunden, bei Raumtemperatur in einer Schüttelvorrichtung, wobei Nanopartikel mit immobilisierten ersten Rezeptor-Einheiten oder Nanopartikel mit immobilisierten ersten und zweiten Rezeptor-Einheiten erhalten werden.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann die Immobilisierung von Rezeptor-Einheiten an die Nanopartikel auch dadurch erfolgen, dass unter Verwendung eines Peptides bekannter Sequenz

und geeigneter Länge, von dem bekannt ist, dass es an den verwendeten Rezeptor, also das verwendete MHC-Molekül binden kann, sowie der ersten Rezeptor-Einheit und der zweiten Rezeptor-Einheit in Lösung ein Peptid-präsentierender Rezeptor hergestellt wird. Der so hergestellte Peptid-präsentierende Rezeptor wird dann an den Nanopartikeln immobilisiert und die dabei erhaltenen Nanopartikeln mit den immobilisierten Peptid-präsentierenden Rezeptor werden dann einer Behandlung zur Entfernung von mindestens dem gebundenen Peptid unterworfen, so dass Nanopartikel mit einer oder mehreren immobilisierten Rezeptor-Einheiten erhalten werden. Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass der Peptid-präsentierende Rezeptor durch Inkubation der ersten Rezeptor-Einheit, der zweiten Rezeptor-Einheit und des eingesetzten Peptides in einem Puffer, enthaltend 100 mM Tris, 2 mM EDTA, 400 mM L-Arginin, 5 mM reduziertes Glutathion und 0,5 mM oxidiertes Glutathion über einen Zeitraum von mehr als 36 Stunden, vorzugsweise 48 Stunden, bei einer Temperatur von weniger als 20°C, vorzugsweise 10°C, hergestellt wird.

Wird zur Herstellung des Peptid-präsentierenden Rezeptors eine erste Rezeptor-Einheit mit ersten funktionellen Gruppen und eine zweite Rezeptor-Einheit, die keine funktionellen dritten Gruppen enthält, verwendet, wird der in Lösung hergestellte Peptid-präsentierende Rezeptor nur durch Bindung der ersten funktionellen Gruppe der ersten Rezeptor-Einheit an die zweite funktionelle Gruppe der Nanopartikel an den Nanopartikeln immobilisiert. Werden hingegen zur Herstellung des Peptid-präsentierenden Rezeptors in Lösung eine erste Rezeptor-Einheit mit ersten funktionellen Gruppen und eine zweite Rezeptor-Einheit mit dritten funktionellen Gruppen eingesetzt, so erfolgt die Immobilisierung des Rezeptor-Ligand-

Komplexes an die Nanopartikel über die Bindung zwischen der ersten und zweiten funktionellen Gruppe und die Bindung der dritten und vierten funktionellen Gruppe.

- 5 Nach Immobilisierung des Peptid-präsentierenden Rezeptors an den Nanopartikeln werden die so erhaltenen Nanopartikel mit dem immobilisierten Rezeptor-Ligand-Komplex mit einem Stripping-Puffer, pH-Wert 3,0, enthaltend 50 mM Natriumcitrat, über einen Zeitraum von weniger als 20 Sekunden, vorzugsweise 10 Sekunden, behandelt. Erfindungsgemäß wird dabei im Falle, dass der Rezeptor-Ligand-Komplex nur durch Bindung der ersten funktionellen Gruppe an die zweite funktionelle Gruppe immobilisiert ist, bei der Behandlung der erhaltenen Nanopartikel neben dem gebundenen Peptid auch die zweite Rezeptor-Einheit von den Nanopartikeln entfernt, so dass ein Nanopartikel mit der immobilisierten ersten Rezeptor-Einheit erhalten wird. Im Falle, dass der Peptid-präsentierende Rezeptor durch Bindung der ersten funktionellen Gruppe der ersten Rezeptor-Einheit an die zweite funktionelle Gruppe der Nanopartikel und Bindung der dritten funktionellen Gruppe der zweiten Rezeptor-Einheit an die vierte funktionelle Gruppe der Nanopartikel an den Nanopartikeln immobilisiert ist, wird bei der Behandlung der erhaltenen Nanopartikel mit dem Stripping-Puffer nur das gebundene Peptid von den Nanopartikeln entfernt. Dabei werden also Nanopartikel mit der immobilisierten ersten und zweiten Rezeptor-Einheit erhalten. Die so hergestellten Nanopartikel, die entweder die immobilisierte erste Rezeptor-Einheit oder die immobilisierte erste und zweite Rezeptor-Einheit enthalten, können dann, gegebenenfalls nach einer Aufreinigung, beispielsweise mittels mindestens einer Zentrifugation und mindestens eines Waschvorganges, vom Puffer abgetrennt und erneut in einem geeigneten Puffer suspendiert werden. Die so erhal-
- 10
- 15
- 20
- 25

tenen Nanopartikel können zur Durchführung der kompetitiven Bindungsreaktionen der hergestellten Population von Peptidfragmenten eingesetzt werden.

- 5 Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die kompetitive Bindung der hergestellten Peptidfragment-Population an die Nanopartikel, die die erste oder die erste und zweite immobilisierte Rezeptor-Einheit aufweisen, mittels Inkubation der Peptidfragment-Population mit den Nanopartikeln in einem PBS-Puffer über einen Zeitraum von 2 Stunden bis 6 Stunden, vorzugsweise 4 Stunden, bei einer Temperatur von Raumtemperatur bis 39°C, vorzugsweise 37°C, durchgeführt. Wird. Falls die Nanopartikel nur die immobilisierte erste Rezeptor-Einheit aufweisen, enthält der zur kompetitiven Bindung verwendete PBS-Puffer auch die zweite Rezeptor-Einheit.

- 15 Nach Bindung des oder der Peptid-Fragmente mit Affinität zu einer oder den beiden Rezeptor-Einheiten wird ein immobilisierter Rezeptor-Ligand-Komplex erhalten, der dann mittels einer Zentrifugation und mindestens eines Waschvorganges vom Puffer und den nicht gebundenen Peptid-Fragmenten der Population abgetrennt und erneut in einem Puffer suspendiert wird.

- 20 Anschließend erfolgt erfindungsgemäß die Analyse des erhaltenen Peptid-präsentierenden Rezeptors und/oder des gebundenen Peptid-Fragmentes. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die Suspension der Nanopartikel, die den immobilisierten Peptid-präsentierenden Rezeptor mit dem gebundenen Peptid aufweisen, 25 mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorptions-Ionisations- (MALDI)-Verfahren analysiert werden.

Bei den MALDI-Verfahren handelt es sich um massenspektrometrische Verfahren. Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren zur Strukturaufklärung von Substanzen, wobei atomare und molekulare Teilchen entsprechend ihrer Masse abgetrennt werden. Sie beruht auf einer Reaktion zwischen Molekülen und Elektronen oder Photonen. Durch Beschuss der Probe mit Elektronen entstehen infolge der Abspaltung von Elektronen positive Molekülionen, die anschließend in verschiedene ionische, radikalische und/oder neutrale Fragmente zerfallen. Molekülionen und Fragmente werden in geeigneten Trennsystemen nach der Größe der Massezahl aufgetrennt. Bei einer Massenspektrometrie werden also die aufgrund chemischer Zerfallsreaktionen infolge eines Ionisationsprozesses entstehenden Molekülionen beziehungsweise Fragmente zur Strukturaufklärung von Stoffen herangezogen. Ein erfindungsgemäß bevorzugt eingesetztes MALDI-Verfahren ist das MALDI-TOF-MS-Verfahren (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie). Die Hauptvorteile dieses Verfahrens umfassen die äußerst schnelle positive Identifizierung eines zu analysierenden Stoffes, beispielsweise eines Proteins oder Peptides, durch dessen Masse- zu Ladungs-Verhältnis (m/z) und die äußerst geringe Nachweisgrenze, die im Femtomol-Bereich oder darunter liegt.

Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass die erhaltenen Nanopartikel, beispielsweise in Form einer Suspension, nach Zentrifugieren und Waschen auf einem MALDI-Probenträger oder MALDI-Target abgeschieden und analysiert werden. Dabei kann eine im Verlauf des MALDI-Verfahrens, insbesondere MALDI-TOF-MS-Verfahrens eingesetzte Matrix vor oder nach dem Abscheiden der Nanopartikel-haltigen Suspension oder gemeinsam damit auf den MALDI-Probenträger aufgetragen werden.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass das in dem immobilisierten Rezeptor-Ligand-Komplex gebundene mindestens eine Peptid-Fragment aus dem Rezeptor herausgelöst, isoliert und analysiert wird. Beispielsweise können die Nanopartikel, die den immobilisierten Rezeptor mit dem mindestens einen gebundenen Peptid-Fragment aufweisen, zur Freisetzung des Peptid-Fragmentes in einem Stripping-Puffer, pH-Wert 3,0, enthaltend 50 mM Natriumcitrat, über einen Zeitraum von weniger als 20 Sekunden, vorzugsweise 10 Sekunden, behandelt werden. Erfindungsgemäß besteht auch die Möglichkeit, dass das mindestens eine Peptid-Fragment, falls es eine fünfte funktionelle Gruppe aufweist, unter Verwendung von Nanopartikeln isoliert und aufgereinigt wird. In diesem Fall enthalten diese Nanopartikel eine die fünfte funktionelle Gruppe bindende sechste funktionelle Gruppe, so dass die Möglichkeit gegeben ist, die freigesetzten Peptid-Fragmente spezifisch aus einer wässrigen Lösung oder Suspension zu isolieren. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass das mindestens eine isolierte Peptidfragment anschließend sequenziert wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Peptid-Impfstoffes gegen ein Protein-Antigen, insbesondere gegen das Protein-Antigen exprimierende oder präsentierende Zellen oder biologische Materialien, wobei die Aminosäuresequenz eines T-Zell-Epitopes des Protein-Antigens in vitro identifiziert wird, ein Peptid mit der identifizierten Aminosäuresequenz hergestellt wird und in bevorzugter Ausführung danach unter Verwendung des hergestellten Peptides und einer ersten und gegebenenfalls zweiten Rezeptor-Einheit, insbesondere einer ersten und zweiten Kette eines MHC-Moleküls, ein Rezeptor-Ligand-Komplex, insbesondere ein Peptid-präsentierendes MHC-Molekül hergestellt wird, welches als

Impfstoff eingesetzt werden kann. Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst

- a) die Bereitstellung einer Population von Peptid-Fragmenten des Protein-Antigens,
- 5 b) die Bereitstellung von Nanopartikeln, die an ihrer Oberfläche mindestens eine erste immobilisierte Kette eines MHC-Moleküls aufweisen, wobei die Kette eine die Bildung eines MHC-Moleküls ermöglichende Konformation aufweist,
- 10 c) die Durchführung einer kompetitiven Bindung der Peptidfragment-Population an die an den Nanopartikeln immobilisierte erste Kette, optional und vorzugsweise in Gegenwart einer zweiten Kette eines MHC-Moleküls, wobei das Peptidfragment mit Affinität, insbesondere der größten Affinität zu der ersten Kette, insbesondere zu den beiden Ketten des MHC-Moleküls, gegebenenfalls zusammen mit der zweiten Kette, an die erste Kette bindet und ein Peptid-präsentierendes MHC-Molekül erhalten wird, und
- 15 d) die Isolierung des Peptid-Fragmentes aus dem MHC-Molekül und Bestimmung seiner Aminosäuresequenz zum Erhalt des Peptid-Impfstoffes, der in Form des Peptidfragmentes selbst
- 20 oder seines MHC-Komplexes eingesetzt werden kann.

Optional können sich daran die folgenden Schritte anschließen

- 1) gentechnische Herstellung oder chemische Synthese eines Peptids auf der Basis der bestimmten Aminosäu-

resequenz des Peptid-Fragmentes in geeigneten Mengen,

2) gentechnische Herstellung oder chemische Synthese der ersten und zweiten Kette in geeigneten Mengen,

5 3) Herstellung von Peptid-präsentierenden MHC-Molekülen in geeigneten Mengen durch gemeinsame Inkubation der ersten Kette, der zweiten Kette und des hergestellten Peptids, und

10 4) Herstellung eines Peptid-Impfstoffes in Form eines Lyophilisats oder einer wässrigen kolloidalen Lösung oder Suspension der Peptid-präsentierenden MHC-Moleküle.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem „Impfstoff“ eine Zusammensetzung zur Erzeugung einer Immunität zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Krankheitszuständen verstanden. Impfstoffe sind daher Arzneimittel, die Antigene enthalten, und die dazu bestimmt sind, bei Mensch oder Tieren zur Erzeugung von spezifischen Abwehr- und Schutzstoffen mittels Impfen angewandt zu werden. Impfstoffe dienen zur aktiven Bildung von Antikörpern.

15
20

Erfindungsgemäß ist dabei vorgesehen, dass die Population von Peptid-Fragmenten des Protein-Antigens mittels enzymatischer Protein-Spaltung, gentechnischer Verfahren oder chemischer Syntheseverfahren hergestellt wird. In bevorzugter Ausführungsform repräsentieren die in der Peptid-Population enthaltenen Peptide die gesamte Aminosäuresequenz des Protein-Antigens vollständig. In einer alter-

25

nativen Ausführungsform repräsentieren die in der Peptid-Population enthaltenen Peptidfragmente die Aminosäuresequenz des Protein-Antigens nur teilweise, wobei die Peptid-Fragmente der Population vorzugsweise solche Aminosäuresequenzen aufweisen, die mittels
5 eines Computer-Algorithmus bestimmte potentielle T-Zell-Epitope darstellen. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die Peptid-Fragmente, wenn das herzustellende MHC-Molekül ein MHC-Molekül Typ I ist, eine Länge von 8 bis 10 Aminosäuren aufweisen. Wenn das herzustellende MHC-Molekül ein MHC-Molekül Typ II ist,
10 weisen die Peptid-Fragmente vorzugsweise eine Länge von 15 bis 24 Aminosäuren auf.

Wenn das herzustellende MHC-Molekül ein MHC-Molekül Typ I ist, handelt es sich bei der ersten Kette um eine schwere Kette von etwa 45 kDa und bei der zweiten Kette um eine leichte Kette von etwa 12
15 kDa. Insbesondere handelt es sich in diesem Fall bei der ersten Kette um ein HLA-A-, HLA-B- oder HLA-C-Monomer und bei der zweiten Kette um β -2-Mikroglobulin.

Wenn das herzustellende MHC-Molekül ein MHC-Molekül Typ II ist, handelt es sich erfindungsgemäß bei der ersten Kette um eine α -
20 Kette von etwa 34 kDa und bei der zweiten Kette um eine β -Kette von etwa 30 kDa. Vorzugsweise handelt es sich in diesem Fall bei der ersten Kette und der zweiten Kette um HLA-DR-, HLA-DQ- oder HLA-DP-Monomere. Sowohl die Ketten der MHC-Typ I- als auch der MHC-Typ II-Klasse können in mutierter, abgewandelter, modifizierter,
25 insbesondere verkürzter Form eingesetzt werden.

Vorzugsweise enthält die erste Kette eine erste funktionelle Gruppe, so dass die erste Kette durch Bindung der ersten funktionellen

Gruppe an einer auf der Oberfläche der Nanopartikel vorhandene zweite funktionelle Gruppe an der Oberfläche der Nanopartikel immobilisiert wird. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die funktionelle Gruppe ein natürlicher Bestandteil der ersten Kette ist oder mittels gentechnischer Verfahren, biochemischer, enzymatischer und/oder chemischer Derivatisierung oder chemischer Syntheseverfahren in die erste Kette eingeführt ist. Bei der ersten funktionellen Gruppe handelt es sich vorzugsweise um eine Gruppe ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Carboxy-Gruppen, Amino-Gruppen Thiol-Gruppen, Biotin-Gruppen, His-Tag, Flag-Tag, Strep-Tag I-Gruppen, Strep-Tag II-Gruppen, Histidin-Tag-Gruppen und Flag-Tag-Gruppen. Die an der Oberfläche der Nanopartikel vorhandene zweite funktionelle Gruppe ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Amino-Gruppen, Carboxy-Gruppen, Maleinimido-Gruppen, Avidin-Gruppen, Streptavidin-Gruppen, Neutravidin-Gruppen und Metallgelatkomplexen. Dabei kann die zweite funktionelle Gruppe mittels Pfropfsilanisierung, Silanisierung, chemischer Derivatisierung oder ähnlicher geeigneter Verfahren auf die Oberfläche der Nanopartikel aufgebracht sein. Bei den einzusetzenden Nanopartikeln handelt es sich vorzugsweise um solche, die einen Kern aus einem chemisch inerten Material, vorzugsweise Silika, und einen Durchmesser von 30 bis 400 nm, vorzugsweise 50 nm bis 150 nm, aufweisen.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die an ihrer Oberfläche eine erste immobilisierte Kette aufweisende Nanopartikel durch folgende Schritte erhalten:

a) Inkubation der die erste funktionelle Gruppe enthaltende erste Kette, der zweiten Kette und eines Peptids, von dem die Aminosäu-

resequenz und die Fähigkeit zur Bildung eines MHC-Moleküls unter geeigneten Bedingungen bekannt ist,

5 b) Inkubation des gebildeten MHC-Moleküls mit Nanopartikeln, deren Oberfläche eine die erste funktionelle Gruppe bindende zweite funktionelle Gruppe aufweist, unter geeigneten Bedingungen zur Immobilisierung des MHC-Moleküls an den Nanopartikeln,

10 c) Behandlung des Nanopartikels mit den immobilisierten MHC-Molekülen mit einem geeigneten Puffer zur Entfernung der zweiten Kette und des Peptids bekannter Aminosäuresequenz aus dem MHC-Molekül, und

d) Aufreinigung der die erste immobilisierte Kette aufweisenden Nanopartikel.

15 Erfindungsgemäß ist bevorzugt vorgesehen, dass die kompetitive Bindung der Peptidfragment-Population an die die erste immobilisierte Kette aufweisende Nanopartikels durch Inkubation der Peptid-Fragment-Population mit den Nanopartikeln in einem geeigneten Puffer unter geeigneten Bedingungen erfolgt. Nach Bindung des
20 mindestens einen Affinität aufweisenden Peptidfragmentes der Population und gegebenenfalls der zweiten Kette unter Bildung eines immobilisierten MHC-Moleküls werden die Nanopartikel mit den immobilisierten MHC-Molekül mittels Zentrifugation und Waschen vom Puffer und den nicht gebundenen Peptid-Fragmenten abgetrennt. Anschließend werden die das immobilisierte MHC-Molekül aufweisende Nanopartikel mit einem geeigneten Puffer, beispielsweise einem
25 Stripping-Puffer, zur Freisetzung des gebundenen Peptid-Fragmentes behandelt. Das freigesetzte Peptid-Fragment wird dann isoliert und seine Aminosäuresequenz ermittelt.

Auf der Basis der ermittelten Aminosäuresequenz kann das gebundene Peptid-Fragment anschließend in großen Mengen, beispielsweise unter Verwendung gentechnischer Verfahren hergestellt werden. Beispielsweise kann auf der Basis der ermittelten Aminosäuresequenz des freigesetzten Peptid-Fragmentes eine die ermittelte Aminosäuresequenz codierende Nucleinsäure erzeugt und in einen geeigneten Expressionsvektor inseriert werden. Dieser Vektor wird dann in eine geeignete Wirtszelle zur Expression der Aminosäuresequenz überführt. Dadurch kann in der Wirtszelle ein Peptid in größeren Mengen exprimiert und daraus isoliert werden.

Auf der Basis der ermittelten Aminosäuresequenz des freigesetzten Peptid-Fragmentes lässt sich auch eine größere Peptid-Menge auf synthetischem Wege herstellen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Qualitätskontrolle von Rezeptor-Ligand-Komplexen und/oder deren Bestandteilen, umfassend die Herstellung oder Bereitstellung eines Rezeptor-Ligand-Komplexes in Lösung aus mindestens einer Rezeptor-Einheit, vorzugsweise zwei Rezeptor-Einheiten, wobei mindestens eine Rezeptor-Einheit eine erste funktionelle Gruppe aufweist, und eines Liganden, die Immobilisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes an Nanopartikeln, die an ihrer Oberfläche mindestens eine die erste funktionelle Gruppe bindende zweite funktionelle Gruppe aufweisen, und Analyse der den immobilisierten Rezeptor-Ligand-Komplex aufweisenden Nanopartikel unter Verwendung eines MALDI-Verfahrens.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem Rezeptor um ein MHC-Molekül, bei dem der Liganden um ein an den Rezeptor bindendes Peptid bekannter Sequenz und definierter Länge und bei dem Re-

zeptor-Ligand-Komplex um ein Peptid-präsentierendes MHC-Molekül.

5 In einer Ausführungsform handelt es sich bei dem Rezeptor um ein MHC-Molekül der Klasse I, wobei die Rezeptor-Einheiten eine schwere Kette von etwa 45 kDa und die Rezeptor-Einheit eine leichte Kette von etwa 12 kDa sind. Dabei ist die schwere Kette ein HLA-A-, HLA-B- oder HLA-C-Monomer und die leichte Kette β -2-Microglobulin.

10 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der Rezeptor ein MHC-Molekül der Klasse II, wobei eine Rezeptor-Einheit eine α -Kette von etwa 34 kDa und eine Rezeptor-Einheit eine β -Kette von etwa 30 kDa ist. Dabei sind die α -Kette und die β -Kette HLA-DR-, HLA-DQ- oder HLA-DP-Monomere.

15 Zur Analyse wird erfindungsgemäß ein MALDI-Verfahren, insbesondere ein MALDI-TOF-Verfahren eingesetzt.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln, die an ihrer Oberfläche mindestens eine immobilisierte Rezeptor-Einheit oder einen immobilisierten Rezeptor aufweisen, umfassend

- 20 a) Herstellung eines Rezeptor-Ligand-Komplexes durch Inkubation einer ersten Rezeptor-Einheit mit einer ersten funktionellen Gruppe, gegebenenfalls in bevorzugter Ausführungsform einer zweiten Rezeptor-Einheit, die mit der ersten Rezeptor-Einheit einen Rezeptor bilden kann, und eines
- 25 Liganden in Lösung,
- b) Immobilisierung des gebildeten Rezeptor-Ligand-Komplexes an Nanopartikeln, die mindestens eine die erste funktionelle Gruppe bindende zweite funktionelle Gruppen an der Oberfläche aufweisen, und

- c) Behandlung der den immobilisierten Rezeptor-Ligand-Komplex aufweisenden Nanopartikel mit einem sauren Puffer zur Freisetzung mindestens des gebundenen Liganden, wobei Nanopartikel mit immobilisierten Rezeptor-Einheiten erhalten werden.

5

10 In einer Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Immobilisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes an der Nanopartikel-Oberfläche ausschließlich über die Bindung der ersten funktionellen Gruppe der ersten Rezeptor-Einheit an die zweite funktionelle Gruppe der Nanopartikel. In diesem Fall wird nach Behandlung der den immobilisierten Rezeptor-Ligand-Komplex aufweisenden Nanopartikel mit einem sauren Puffer neben dem Liganden auch die zweite Rezeptor-Einheit freigesetzt und es werden Nanopartikel mit der immobilisierten ersten Rezeptor-Einheit erhalten.

15 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weist die zweite Rezeptor-Einheit eine dritte funktionelle Gruppe auf, während die Nanopartikel an ihrer Oberfläche eine die dritte funktionelle Gruppe der zweiten Rezeptor-Einheit bindende vierte funktionelle Gruppe aufweisen. Die Immobilisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes an den Nanopartikeln erfolgt also über die Bindung der ersten funktionellen Gruppe der ersten Rezeptor-Einheit an die zweite funktionelle Gruppe der Nanopartikel und die Bindung der dritten funktionellen Gruppe der zweiten Rezeptor-Einheit an die vierte funktionelle Gruppe der Nanopartikel. In diesem Fall wird nach
20 Behandlung der den immobilisierten Rezeptor-Ligand-Komplex aufweisenden Nanopartikel mit einem sauren Puffer ausschließlich der Ligand freigesetzt und es werden Nanopartikel mit der immobilisierten ersten und zweiten Rezeptor-Einheit erhalten. Vorzugsweise liegen die erste und zweite Rezeptor-Einheit gerichtet immobilisiert vor
25 und bilden einen Rezeptor, der einen Liganden binden kann.
30

In bevorzugter Ausführungsform ist der Rezeptor ein MHC-Molekül, der Ligand ein an den Rezeptor bindendes Peptid bekannter Sequenz und definierter Länge und der Rezeptor-Ligand-Komplex ein Peptid-präsentierendes MHC-Molekül.

- 5 Insbesondere ist der Rezeptor ein MHC-Molekül der Klasse I, der als erste Einheit eine schwere Kette von etwa 45 kDa und als zweite Rezeptor-Einheit eine leichte Kette von etwa 12 kDa aufweist oder als erste Rezeptor-Einheit eine leichte Kette von etwa 12 kDa und als zweite Rezeptor-Einheit eine schwere Kette von etwa 45 kDa. Bei
10 der schweren Kette handelt es sich um ein HLA-A-, HLA-B- oder HLA-C-Monomer und bei der leichten Kette um β -2-Microglobulin.

- In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Rezeptor ein MHC-Molekül der Klasse II, der als erste Rezeptor-Einheit eine α -Kette von etwa 34 kDa und als zweite Rezeptor-Einheit eine β -Kette von etwa 30 kDa aufweist oder als erste Rezeptor-Einheit eine β -Kette von etwa 30 kDa und als zweite Rezeptor-Einheit eine α -Kette von etwa 34 kDa. Bei der α -Kette und der β -Kette handelt es sich um HLA-DR-, HLA-DQ- oder HLA-DP-Monomere.
15

- 20 Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass sich die erste funktionelle Gruppe und die dritte funktionelle Gruppe voneinander unterscheiden und ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Carboxy-Gruppen, Amino-Gruppen, Thiol-Gruppen, Biotin-Gruppen, His-Tag, FLAG-Tag, Strep-Tag I-Gruppen, Strep-Tag II-Gruppen, Histidin-Tag-Gruppen und FLAG-Tag-Gruppen.
25

- Erfindungsgemäß ist ebenfalls vorgesehen, dass sich die zweite funktionelle Gruppe an der Nanopartikel-Oberfläche, die die erste funktionelle Gruppe bindet, und die vierte funktionelle Gruppe an der Nanopartikel-Oberfläche, die die dritte funktionelle Gruppe bindet,
30 voneinander unterscheiden und ausgewählt sind aus der Gruppe

bestehend aus Amino-Gruppen, Carboxy-Gruppen, Maleinimido-Gruppen, Avidin-Gruppen, Streptavidin-Gruppen, Neutravidin-Gruppen und Metallchelatkomplex.

- 5 Vorzugsweise werden die den immobilisierten Rezeptor-Peptid-Komplex aufweisenden Nanopartikel zur Entfernung des gebundenen Peptids mit einem Stripping-Puffer, pH-Wert 3,0, enthaltend 50 mM Natriumcitrat, über einen Zeitraum von weniger als 20 s, vorzugsweise 10 s, behandelt.

- 10 Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln mit immobilisierten Peptid-präsentierenden MHC-Molekülen, wobei Nanopartikel mit mindestens einer ersten immobilisierten Kette eines MHC-Moleküls, die nach einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln mit mindestens einer immobilisierten Rezeptor-Einheit oder mit einem
15 immobilisierten Rezeptor hergestellt wurden, in Gegenwart einer zweiten Kette, die mit der ersten Kette ein MHC-Molekül bilden kann, mit einem Peptid, das an das MHC-Molekül binden kann, inkubiert und ein an den Nanopartikeln immobilisierter Peptid-präsentierendes MHC-Molekül erhalten wird.

- 20 Bei dem MHC-Molekül handelt es sich vorzugsweise um ein Molekül der Klasse I, wobei das Peptid eine Länge von etwa 8 bis etwa 10 Aminosäuren aufweist. Bei dem MHC-Molekül kann es sich auch um ein Molekül der Klasse II handeln, wobei das Peptid eine Länge von etwa 15 bis etwa 24 Aminosäuren aufweist.

- 25 Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Anreicherung und/oder Isolierung spezifischer CD4⁺-T-Lymphocyten oder CD8⁺-T-Lymphocyten aus peripheren mononucleären Blutzellen (PBMCs), umfassend

- 5
- a) Herstellung von Nanopartikeln mit immobilisierten Peptid-präsentierenden MHC-Molekülen, wobei das Peptid ein T-Zell-Epitop ist
- b) Isolierung peripherer mononucleärer Blutzellen aus einem geeigneten Ausgangsmaterial,
- 10
- c) Inkubation der isolierten mononucleärer Blutzellen mit den die immobilisierten Peptid-präsentierenden MHC-Molekülen aufweisenden Nanopartikeln, wobei T-Lymphozyten an das T-Zell-Epitop der immobilisierten Peptid-präsentierenden MHC-Moleküle binden,
- d) Abtrennung der Nanopartikel mit den an die immobilisierten Peptid-präsentierenden MHC-Molekülen gebundenen T-Lymphozyten von den nicht-gebundenen peripheren mononucleären Zellen.
- 15
- Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die gebundenen T-Lymphozyten von den Nanopartikeln anschließend freigesetzt und in vitro clonal vermehrt werden. Die freigesetzten und/oder clonal vermehrten T-Lymphozyten können dann beispielsweise in einen Organismus eingeführt werden.
- 20
- In bevorzugter Ausführungsform der Erfindung ist das Peptid-präsentierende MHC-Molekül ein Molekül der Klasse I und die gebundenen T-Lymphozyten sind CD8⁺-T-Lymphocyten. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Peptid-präsentierende MHC-Molekül ein Molekül der Klasse II, wobei die gebundenen T-
- 25
- Lymphocyten CD4⁺-T-Lymphocyten sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum Primen und/oder Restimulieren einer CD4⁺-T- und/oder CD8⁺-T-Lymphocyten-Reaktion in vitro, umfassend

- a) Identifizierung eines T-Zell-Epitops und Bestimmung von dessen Aminosäuresequenz,
 - b) Herstellung einer Nucleinsäure, die ein Peptid mit der Aminosäuresequenz des T-Zell-Epitops codiert,
 - 5 c) Einführung der bei b) hergestellten Nucleinsäure in einen geeigneten Vektor,
 - d) Einführung des bei c) erhaltenen Vektors in dendritische Zellen, die gegebenenfalls aus kultivierten peripheren mononucleären Blutzellen isoliert wurden,
 - 10 e) Vermehrung der bei d) resultierenden, den Vektor aufweisenden dendritischen Zellen in vitro, und
 - f) Stimulation autologer CD4⁺ und/oder CD8⁺-Zellen in vitro unter Verwendung der bei d) oder e) erhaltenen dendritischen Zellen.
- 15 Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls Nanopartikel, enthaltend an der Oberfläche mindestens eine Rezeptor-Einheit, insbesondere eine immobilisierte Kette eines MHC-Moleküls. Dabei kann die immobilisierte Kette durch Bindung eines Peptids von 8 bis 24 Aminosäuren und einer zweiten Kette eines MHC-Moleküls ein Peptid-
- 20 präsentierendes MHC-Molekül bilden. Die MHC-Molekül-Kette ist durch Bindung einer in ihr enthaltenen ersten funktionellen Gruppe mit einer an der Nanopartikel-Oberfläche vorhandenen zweiten funktionellen Gruppe an der Nanopartikel-Oberfläche immobilisiert. Bei den erfindungsgemäßen Nanopartikeln entweder die schwere Kette
- 25 oder die leichte Kette eines MHC-Moleküls der Klasse I oder entweder die α -Kette oder die β -Kette eines MHC-Moleküls der Klasse II in immobilisierter Form.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Nanopartikel mit einem immobilisierten MHC-Molekül, wobei das MHC-Molekül eine erste und zweite Kette umfasst und das MHC-Molekül durch Bindung einer in der ersten Kette enthaltenen ersten funktionellen Gruppe mit einer
5 an der Nanopartikel-Oberfläche vorhandenen zweiten funktionellen Gruppe oder durch Bindung der in der ersten Kette enthaltenen ersten funktionellen Gruppe mit der an der Nanopartikel-Oberfläche vorhandenen zweiten funktionellen Gruppe und Bindung einer in der zweiten Kette enthaltenen dritten funktionellen Gruppe mit einer an
10 der Nanopartikel-Oberfläche vorhandenen vierten funktionellen Gruppe an der Nanopartikel-Oberfläche immobilisiert ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls Nanopartikel mit einem an der Nanopartikel-Oberfläche immobilisierten Peptid-präsentierenden MHC-Molekül, wobei das Peptid-präsentierende
15 MHC-Molekül eine erste Kette, eine zweite Kette und ein Peptid von 8 bis 24 Aminosäuren umfasst und das MHC-Molekül durch Bindung einer in der ersten Kette enthaltenen ersten funktionellen Gruppe mit einer an der Nanopartikel-Oberfläche vorhandenen zweiten funktionellen Gruppe oder durch Bindung der in der ersten Kette enthaltenen
20 ersten funktionellen Gruppe mit der an der Nanopartikel-Oberfläche vorhandenen zweiten funktionellen Gruppe und Bindung einer in der zweiten Kette enthaltenen dritten funktionellen Gruppe mit einer an der Nanopartikel-Oberfläche vorhandenen vierten funktionellen Gruppe an der Nanopartikel-Oberfläche immobilisiert ist.

25 Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen Peptid-Impfstoff umfassend mindestens ein Peptid-präsentierendes MHC-Molekül oder das erfindungsgemäß identifizierte Peptidfragment selbst, wobei der Peptid-Impfstoff gemäß erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich ist.

In einer Ausführungsform kann der Peptid-Impfstoff als Lyophilisat vorliegen. In einer anderen Ausführungsform liegt der Impfstoff als wässrige kolloidale Lösung oder Suspension vor. Der erfindungsgemäße Peptid-Impfstoff kann zusätzlich mindestens ein Adjuvans enthalten.

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls einen Kit zur Identifizierung und/oder zum Nachweis von T-Zell-Epitopen eines Protein-Antigens in vitro, umfassend einen Behälter mit einer Suspension von Nanopartikeln mit einem immobilisierten MHC-Molekül. In einer weiteren Ausführungsform kann der Kit einen Behälter mit einer Suspension von Nanopartikeln mit daran immobilisierten ersten Ketten eines MHC-Moleküls sowie einen Behälter mit einem Lyophilisat einer zweiten Kette umfassen.

10

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung eines erfindungsgemäßen Nanopartikels zur Identifizierung und/oder zum Nachweis von T-Zell-Epitopen eines Protein-Antigens in vitro.

15

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung eines erfindungsgemäßen Nanopartikels zur Herstellung eines Peptid-Impfstoffes.

20

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Nanopartikels zur Anreicherung und/oder Isolierung spezifischer CD4⁺-T-Lymphozyten oder CD8⁺-T-Lymphozyten in vitro.

25

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung eines erfindungsgemäßen Nanopartikels zum Primen und/oder Restimulieren einer CD4⁺-T- oder/und CD8⁺-T-Lymphozyten-Reaktion in vitro. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung eines erfin-

dungsgemäßen Peptid-Impfstoffes zur aktiven Immunisierung eines tierischen oder menschlichen Organismus gegen ein Protein-Antigen.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der folgenden Figuren 1 bis 3
5 und Beispiele näher erläutert.

Figur 1 zeigt in schematischer Form eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifizierung und/oder zum Nachweis von T-Zell-Epitopen, wobei ein in Lösung hergestellter, das Peptid präsentierender HLA-A2-Komplex an Nanopartikeln immobilisiert wird. Anschließend erfolgt eine Behandlung der den Komplex aufweisenden Nanopartikel mit einem sauren „Stripping“-Puffer, wobei das EBV-EBNA-6-Peptid (Position 284-293, LLDFVRFMGV) und β 2-Mikroglobulin (β ₂-m) entfernt werden. Die so hergestellten Nanopartikel mit der immobilisierten HLA-Kette werden
10 dann zur Durchführung einer kompetitiven Bindungsreaktion unter Verwendung einer Peptid-Population in Gegenwart von β ₂-m eingesetzt, wobei das oder die Peptide mit Affinität an HLA und β ₂-m bindet/binden, wobei ein dieses Peptid präsentierender HLA-Komplex an der Nanopartikel-Oberfläche gebildet wird. Nach Entfernung der
15 nicht gebundenen Peptide und von überschüssigem β ₂-m werden die Nanopartikel, die den immobilisierten Peptid-präsentierenden Komplex aufweisen, einer Analyse mittels MALDI-Massenspektrometrie unterworfen.
20

Figur 2 zeigt mittels MALDI-Massenspektrometrie erhaltene Massenspektrogramme von Nanopartikeln mit immobilisierten Peptid-präsentierenden HLA-Komplexen. Figur 2.1 betrifft das Peptidgemisch aus äquimolaren Mengen der in Beispiel 4 genannten 5 Pepti-
25

de und Figur 2.2 die zwei Peptide, die nach Selektion als bindend erkannt wurden.

Figur 3 zeigt das MALDI-Spektrum aller SAV-Nanopartikel-immobilisierter molekularer Komponenten des HLA-A2-EBNA-6-Komplexes. Das Insert zeigt das MALDI-Spektrum des EBNA-6-Peptides $[M+H]^+$ mit der Sequenz LLDFVRFMGV (theoretische monoisotopische Masse $[M+H]^+$ 1196.6502 μ). Der Peak bei 11727 kennzeichnet β_2 -m, die Peaks bei etwa 12900 kennzeichnen die SAV-Nanopartikel in monomerer Form und der Peak bei 34383 kennzeichnet die biotinylierte alpha-Kette.

Beispiel 1

Peptidsynthese

Peptide wurden unter Verwendung des Fmoc-Festphasen-Verfahrens auf einer kontinuierlichen MillGen 9050 Flow-Synthesevorrichtung (Millipore, Bedford, USA) synthetisiert. Nach RP-HPLC-Aufreinigung wurden die Peptide lyophilisiert und in PBS-Puffer in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst.

Beispiel 2

Herstellung von löslichen biotinylierten HLA-A2-Monomeren

Lösliche HLA-A*0201-Peptid-Tetramere wurden synthetisiert, wie von Altman et al., Science, 274 (1996), 94-96, beschrieben. Dabei wurden rekombinante schwere HLA-A*0201-Ketten (Positionen 1-276) in löslicher Form und β -2-Mikroglobulin (β_2 -m) separat in Escherichia coli-Zellen, die mit entsprechenden Expressionplasmiden

transformiert worden waren, exprimiert. Das 3'-Ende der extrazellulären Domänen der schweren HLA-A*0201-Kette wurde mit einer BirA-Biotinylierungssequenz modifiziert. Die *Escherichia coli*-Zellen, die mit den entsprechenden die HLA-A*0201-Kette beziehungsweise β_2 -m codierenden Expressionsplasmiden transformiert worden waren, wurden bis zur mid-log-Wachstumsphase kultiviert. Danach erfolgte eine Induktion mit 0,5 Isopropyl- β -Galactosidase. Nach weiterer Kultivierung und Expression der rekombinanten Proteine wurden die *Escherichia coli*-Zellen geerntet und gereinigt. Nach Zellaufschluss wurden die in den Zellen enthaltenen Einschlusskörperchen isoliert, aufgereinigt und in 8 M Harnstoff, pH 8,0, solubilisiert. Die schwere HLA-A*0201-Kette und β_2 -m wurden in 100 mM Tris, 2 mM EDTA, 400 mM L-Arginin, 5 mM reduziertem Glutathion und 0,5 mM oxidiertem Glutathion verdünnt und mit 10 μ M des Peptides LLDFVRFMGV (EBV EBNA-6, Positionen 284-293) versetzt. Anschließend erfolgte eine 48-stündige Inkubation bei 10°C unter Rühren. Die gefalteten 48 kDa-Komplexe (α -Kette: etwa 35 kDa, β_2 -m: etwa 12 kDa, Peptid: etwa 1 kDa) wurden mittels Ultrafiltrations-Verfahren unter Verwendung einer Membran mit einem Rückhaltevermögen von 10 kDa (Millipore, Bedford, USA) aufkonzentriert und mittels HPSEC-Verfahren unter Verwendung einer Superdex G75 HiLoad 26/60-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden) und 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,8, als Laufpuffer aufgereinigt. Nach Gelfiltration wurden die aufgereinigten Monomere mit einer Biotinligase (BirA; Avidity, Denver, USA) biotinyliert und mittels HPSEC erneut aufgereinigt. Der Komplex wurde anschließend mittels Ultrafiltration auf eine Konzentration von 1 μ g/ μ l eingestellt.

Beispiel 3**Herstellung und Charakterisierung von Streptavidin-modifizierten Nanopartikeln (SAV-Nanoperlen)**

Silika-Partikel wurden, wie von Stoeber et al., J. Coll. inter. Sci., 26 (1968), 62-62, beschrieben, hergestellt. Dabei wurden kugelförmige Silika-Partikel mit einem mittleren hydrodynamischen Partikel-Durchmesser von 100 nm erhalten, wie mittels dynamischen Lichtstreuungs-Messungen mit einer Zetasizer 3000 HSA-Vorrichtung (Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland) bestimmt. 500 µg der Carboxy-modifizierten Partikel wurden mit 15 µg Streptavidin (Roche, Tutzing, Deutschland) gemischt. Das immobilisierte Streptavidin wurde durch Quenchen der Fluoreszenz von Biotin-4-fluorescein quantifiziert. Es zeigte sich, dass die gesamten 15 µg Streptavidin an den Nanopartikeln immobilisiert waren. Etwa 57 % der theoretischen Biotin-Bindungsstellen waren an der Partikel-Oberfläche frei zugänglich. Da $d_{\text{Silica}} = 100 \text{ nm}$, $D_{\text{Silica}} = 4 \text{ g/ml}$ und $M_{\text{Streptavidin}} = 52 \text{ kDa}$ betragen, waren an jedem Partikel etwa 730 Streptavidin-Tetramere gebunden, so dass an der Oberfläche etwa 1600 Biotin-Bindungsstellen frei zugänglich waren. Die Streptavidin-modifizierten Partikel wurden auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml in PBS eingestellt.

Beispiel 4**HLA-A2-Peptid-Selektionstest**

Alle Wasch-Schritte der Nanopartikel wurden mittels 10-minütiger Zentrifugation bei 15000 x g bei 20°C in einer Temperaturkontrollierten Zentrifuge in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen und mittels Re-

suspension der Perlen unter Verwendung einer Mikropipette durchgeführt. 55 µg SAV-Nanopartikel und 3,5 µg des löslichen HLA-A2-Komplexes, der das Peptid LLDFVRFMGV (EBV EBNA-6, Positionen 284-293) enthielt, in 20 µl PBS suspendiert. Das Gemisch wurde

5 2 Stunden bei Raumtemperatur in einem horizontalen Schüttler inkubiert, um eine Sedimentation zu verhindern. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 20°C wurde der Überstand verworfen und die Nanopartikel wurden mit 50 µl Wasser gewaschen. Zur Freisetzung von β_2 m-Molekülen und des im Komplex enthaltenen Peptides LLDFVRFMGV wurden die Perlen in 150 µl „Stripping“-Puffer

10 (50 mM Natriumcitrat, pH 3,0) 90 Sekunden inkubiert und nach Zentrifugation mit 150 µl Wasser gewaschen. Die Perlen wurden dann mit 30 µl PBS, enthaltend 1,2 µg β_2 m-Moleküle (Sigma, München, Deutschland) und ein Peptid-Gemisch, resuspendiert. Das

15 Gemisch umfasste insgesamt 5 Peptide in einer Menge von jeweils 0,072 µg. Die 5 Peptide wiesen die Sequenzen ILMEHIHKL, DQKDHAVF, ALSDHHIYL, VITLVYEK und SNEEPPPPY auf. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 37°C wurden die Nanopartikel mittels Zentrifugation pelletiert und nach Entfernung des Überstandes

20 mit 50 µl PBS-Puffer und anschließend 50 µl Wasser gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Nanopartikel in 0,1 % Wasser/TFA (Vol./Vol.) resuspendiert und auf ein MALDI-Target transferiert. Die Analyse wurde unter Verwendung eines Voyagers

25 DE-STR-Massenspektrometers (Applied Biosystems Foster City, USA) in positive Ion Reflectron-Betriebsweise durchgeführt. Lösungen, die Proteine und Peptide enthielten, wurden auf dem Target mit einem gleichen Matrix-Volumen unter Verwendung einer 1:20-Verdünnung einer gesättigten α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure oder Sinapinsäure in 30 % Acetonitril/0,3 % TFA (Vol./Vol.) gemischt. Alle

MALDI-Spektren wurden unter Verwendung eines Standard-Peptidgemisches extern kalibriert.

Erfindungsgemäß wurden folgende Ergebnisse erhalten:

5 Alle Bestandteile des biotinolierten HLA-A2-Komplexes lassen sich unter Verwendung des MALDI-TOF-Verfahren nachweisen und quantitativ bestimmen.

Vollständige Komplexe, die auf den SAV-Partikeln (SAV-Nanoperlen) über Biotin immobilisiert waren, konnten mittels MALDI-Massenspektrometrie visualisiert werden, wobei die entsprechenden
10 Masse-Signale für die biotinylierte HLA-A2- α -Kette 34379 Da, für β_2 -m-Moleküle 11727 Da, das Streptavidin-Monomer 12907 Da und für das gebundene Peptid LLDFVRFMGV 1196,63 Da betrugen (Figur 3). Unter Verwendung des MALDI-TOF-Verfahrens konnten daher
15 einerseits sowohl die korrekten Eigenschaften des HLA-A2-Komplexes als auch die Wirksamkeit des Verfahrens zur Immobilisierung des biotinylierten Komplexes an die SAV-Nanopartikel kontrolliert werden.

20 HLA-A2-komplexierte SAV-Nanopartikel binden bei kompetitiver Bindung unter Verwendung eines Peptidgemisch nur die für HLA-A2 vorhergesagten Peptide.

Figur 2 zeigt die MALDI-Spektren eines Peptidgemisches umfassend zwei HLA-A2-Peptide, die binden, und drei Peptide, die nicht binden, wobei jedes Peptid etwa in einer Menge von 70 pmol vorlag. Die vorhergesagte Bindung der Peptide wurde mit dem SYFPEITHI-
25 Programm bestimmt, wobei bei einer sehr starken Bindung eine Punktzahl von 32 für das Peptid ILMEHIHKL, bei einer starken Bin-

dung eine Punktzahl von 23 für das Peptid ALSDHHIYL und für die
 drei nicht bindenden Proteine eine Punktzahl von 0 bestimmt wurde.
 Die Unterschiede der Signalintensitäten jedes Peptides in dem ver-
 wendeten Gemisch sind auf unterschiedliche Ionisierungsfähigkeiten
 5 zurückzuführen. Die Identität der beobachteten Peaks wurde mittels
 MALDI-PSD-Sequenzierung bestätigt. Nach Selektion der Peptide
 mit HLA-Rezeptoren verblieben nach Behandlung, das heißt Wa-
 schen mit dem PBS-Puffer, nur die Signale für die bindenden Pepti-
 de. Das im Falle der nicht-bindenden Proteine kein Signal nachweis-
 10 bar war, zeigt, dass keine unspezifischen Wechselwirkungen auftre-
 ten. Die Spektren zeigen die monoisotopische Masse für jedes Pep-
 tid in der protonierten Form ($[M+H]^+$) als auch das Monoisotop in
 Natrium-Form ($[M+Na]^+$).

Ansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung und/oder zum Nachweis von T-Zell-Epitopen eines Protein-Antigens in vitro, wobei eine Population von Peptid-Fragmenten des Antigens einer kompetitiven Bindung an eine erste immobilisierte Rezeptor-Einheit, vorzugsweise in Gegenwart einer zweiten Rezeptor-Einheit, die zusammen mit der ersten Rezeptor-Einheit einen Rezeptor bilden kann, unterworfen wird, wobei mindestens ein Peptid-Fragment mit Affinität zu dem Rezeptor an mindestens die erste, vorzugsweise an die beiden Rezeptor-Einheiten bindet, und das gebundene Peptid-Fragment anschließend isoliert und analysiert wird, umfassend
- 5
- 10
- 15 a) Immobilisierung mindestens der ersten Rezeptor-Einheit, die mindestens eine erste funktionelle Gruppe aufweist, an einem Nanopartikel, dessen Oberfläche mindestens eine die erste funktionelle Gruppe bindende zweite funktionelle Gruppe aufweist,
- 20
- b) Herstellung einer Population von Peptid-Fragmenten des Protein-Antigens, die unterschiedliche Sequenzbereiche des Protein-Antigens umfassen,
- 25 c) Durchführung einer kompetitiven Bindung der Peptidfragment-Population an die am Nanopartikel immobilisierte erste Rezeptor-Einheit, vorzugsweise in Gegenwart einer zweiten Rezeptor-Einheit, wobei mindestens ein Peptid-Fragment mit Affinität
- 30

- 5 zu mindestens der ersten Rezeptor-Einheit, vorzugsweise zu beiden Rezeptor-Einheiten, gegebenenfalls zusammen mit der zweiten Rezeptor-Einheit, an die erste Rezeptor-Einheit bindet und ein an dem Nanopartikel immobilisierter Rezeptor-Peptidfragment-Komplex erhalten wird, und
- 10 d) Analyse des immobilisierten Rezeptor-Peptidfragment-Komplexes und/oder des gebundenen Peptid-Fragments.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die zweite Rezeptor-Einheit vor Durchführung der kompetitiven Bindungsreaktion frei in Lösung vorliegt.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die zweite Rezeptor-Einheit zusammen mit der ersten Rezeptor-Einheit vor Durchführung der kompetitiven Bindungsreaktion in Form eines den Rezeptor bildenden Dimers an dem Nanopartikel immobilisiert wird.
- 20 4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die zweite Rezeptor-Einheit mindestens eine dritte funktionelle Gruppe aufweist und die Oberfläche des Nanopartikels mindestens eine die dritte funktionelle Gruppe bindende vierte funktionelle Gruppe aufweist.
- 25 5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, wobei der Rezeptor gerichtet und unter Beibehaltung seiner biologischen Aktivität an dem Nanopartikel immobilisiert ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Rezeptor ein Haupthistokompatibili-

tätskomplex (MHC)-Molekül, der Rezeptor-Peptid-fragment-Komplex ein Peptid-präsentierendes MHC-Molekül und die erste und die zweite Rezeptor-Einheit Ketten des MHC-Moleküls sind.

5 7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der Rezeptor ein MHC-Molekül der Klasse I ist.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, wobei die erste Rezeptor-Einheit eine schwere Kette von etwa 45 kDa und die zweite Rezeptor-Einheit eine leichte Kette von etwa 12 kDa ist oder die erste Rezeptor-Einheit eine leichte Kette von etwa 12 kDa und die zweite Rezeptor-Einheit eine schwere Kette von etwa 45 kDa ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, wobei die schwere Kette ein HLA-A-, HLA-B- oder HLA-C-Monomer und die leichte Kette β -2-Microglobulin ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9, wobei das im Peptid-präsentierenden MHC-Molekül gebundene Peptid-Fragment von einem endogenen Protein-Antigen stammt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 10, wobei das im Rezeptor-Peptidfragment-Komplex gebundene Peptid-Fragment etwa 8 bis 10 Aminosäuren umfasst.

12. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der Rezeptor ein MHC-Molekül der Klasse II ist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die erste Rezeptor-Einheit eine α -Kette von etwa 34 kD und die zweite Rezeptor-Einheit eine β -Kette von etwa 30 kD ist oder die erste Rezeptor-Einheit eine β -Kette von etwa 30 kDa und die zweite Rezeptor-Einheit eine α -Kette von etwa 34 kDa ist.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei die α -Kette und die β -Kette HLA-DR-, HLA-DQ- oder HLA-DP-Monomere sind.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei das im Rezeptor-Peptidfragment-Komplex gebundene Peptid-Fragment von einem exogenen Protein-Antigen stammt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, wobei das im Rezeptor-Peptidfragment-Komplex gebundene Peptid-Fragment etwa 15 bis 24 Aminosäuren umfasst.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei die erste und die zweite Rezeptor-Einheit natürlicherweise vorkommende oder mittels gentechnischer Verfahren oder chemischer Syntheseverfahren hergestellte Ketten sind.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die erste funktionelle Gruppe ein natürlicher Bestandteil der ersten Rezeptor-Einheit oder mittels gentechnischer Verfahren, biochemischer, enzymatischer und/oder chemischer Derivatisierung oder chemischer Syntheseverfahren in die erste Rezeptor-Einheit eingeführt wird.

19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, wobei die dritte funktionelle Gruppe ein natürlicher Bestandteil der zweiten Rezeptor-Einheit oder mittels gentechnischer Verfahren, biochemischer, enzymatischer und/oder chemischer Derivatisierung oder chemischer Syntheseverfahren in die zweite Rezeptor-Einheit eingeführt wird.
5
20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, wobei sich die erste funktionelle Gruppe und die dritte funktionelle Gruppe voneinander unterscheiden und ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Carboxy-Gruppen, Amino-Gruppen, Thiol-Gruppen, Biotin-Gruppen, His-Tag, FLAG-Tag, Strep-Tag I-Gruppen, Strep-Tag II-Gruppen, Histidin-Tag-Gruppen und FLAG-Tag-Gruppen.
10
15
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, wobei sich die zweite funktionelle Gruppe an der Nanopartikel-Oberfläche, die die erste funktionelle Gruppe bindet, und die vierte funktionelle Gruppe an der Nanopartikel-Oberfläche, die die dritte funktionelle Gruppe bindet, voneinander unterscheiden und ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Amino-Gruppen, Carboxy-Gruppen, Maleinimido-Gruppen, Avidin-Gruppen, Streptavidin-Gruppen, Neutravidin-Gruppen und Metallchelatkomplex.
20
25
22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei die zweite funktionelle Gruppe und die vierte funktionelle Gruppe mittels Pfropfsilanisierung, Silanisierung, chemischer Derivatisierung und ähnlicher geeigneter Verfahren auf die Oberfläche der Nanopartikel aufgebracht sind.
30

23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22, wobei die Nanopartikel einen Kern aus einem chemisch inerten Material, vorzugsweise Silica, aufweisen.
- 5 24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei die Nanopartikel einen Durchmesser von 30 bis 400 nm, vorzugsweise 50 nm bis 150 nm, aufweisen.
- 10 25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, wobei die Population von Peptid-Fragmenten des Protein-Antigens mittels enzymatischer Protein-Spaltung, gentechnischer Verfahren oder chemischer Syntheseverfahren hergestellt wird.
- 15 26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Peptid-Fragmente der Population die gesamte Aminosäuresequenz des Protein-Antigens vollständig repräsentieren.
27. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Peptid-Fragmente der Population die Aminosäuresequenz des Protein-Antigens nur teilweise repräsentieren.
- 20 28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei die Peptid-Fragmente der Population Aminosäuresequenzen aufweisen, die vorhergesagte potentielle T-Zell-Epitope darstellen.
- 25 29. Verfahren nach Anspruch 27 oder 28, wobei die vorhergesagten potentiellen T-Zell-Epitope mittels eines Computer-Algorithmus bestimmt sind.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 29, wobei die Peptid-Fragmente eine Länge von 8 bis 10

Aminosäuren aufweisen, wenn der Rezeptor ein MHC-Molekül Typ I ist.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 29, wobei die Peptid-Fragmente eine Länge von 15 bis 24 Aminosäuren aufweisen, wenn der Rezeptor ein MHC-Molekül Typ II ist.

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 31, wobei die Peptid-Fragmente der Population vor Durchführung der kompetitiven Bindung mit einem Marker und/oder einer fünften funktionellen Gruppe versehen werden.

33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei der Marker ein Fluoreszenzmarker oder radioaktiver Marker ist.

34. Verfahren nach Anspruch 32, wobei sich die fünfte funktionelle Gruppe von der ersten, zweiten, dritten und/oder vierten funktionellen Gruppe unterscheidet und mit diesen keine Bindung eingehen kann.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 34, wobei die Immobilisierung der ersten Rezeptor-Einheit oder die Immobilisierung der ersten und zweiten Rezeptor-Einheit an die Nanopartikel durch eine Inkubation der Rezeptor-Einheit(en) mit den Nanopartikeln in einem PBS-Puffer über einen Zeitraum von 1 h bis 4 h, vorzugsweise 2 h, bei Raumtemperatur in einer Schüttelvorrichtung erfolgt, wobei Nanopartikel mit immobilisierten ersten Rezeptor-Einheiten oder Nanopartikel mit immobilisierten ersten und zweiten Rezeptor-Einheiten erhalten werden.

36. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 34, wobei die Immobilisierung von Rezeptor-Einheit(en) an die Nanopartikel dadurch erfolgt, dass unter Verwendung eines Peptids bekannter Sequenz und geeigneter Länge, der ersten Rezeptor-Einheit und der zweiten Rezeptor-Einheit in Lösung ein Rezeptor-Peptid-Komplex hergestellt wird, der Rezeptor-Peptid-Komplex an den Nanopartikeln immobilisiert wird, die den immobilisierten Rezeptor-Peptid-Komplex aufweisenden Nanopartikel einer Behandlung zur Entfernung mindestens des gebundenen Peptids unterworfen und Nanopartikel mit immobilisierten Rezeptor-Einheiten erhalten werden.

37. Verfahren nach Anspruch 36, wobei der Rezeptor-Peptid-Komplex durch Inkubation der ersten Rezeptor-Einheit, der zweiten Rezeptor-Einheit und des Peptids in einem Puffer, enthaltend 100 mM Tris, 2 mM EDTA, 400 mM L-Arginin, 5 mM reduziertes Glutathion und 0,5 mM oxidiertes Glutathion über einen Zeitraum von mehr als 36 h, vorzugsweise 48 h, bei einer Temperatur von weniger als 20°C, vorzugsweise 10°C, hergestellt wird.

38. Verfahren nach Anspruch 36 oder 37, wobei der Rezeptor-Peptid-Komplex allein durch Bindung der ersten funktionellen Gruppe der ersten Rezeptor-Einheit an die zweite funktionelle Gruppe der Nanopartikel an den Nanopartikeln immobilisiert wird.

39. Verfahren nach Anspruch 36 oder 37, wobei der Rezeptor-Peptid-Komplex durch Bindung der ersten funktionellen Gruppe der ersten Rezeptor-Einheit an die zweite funktionelle Gruppe der Nanopartikel und

Bindung der dritten funktionellen Gruppe der zweiten Rezeptor-Einheit an die vierte funktionelle Gruppe der Nanopartikel an den Nanopartikeln immobilisiert wird.

5 40. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 39,
wobei die den immobilisierten Rezeptor-Peptid-
Komplex aufweisenden Nanopartikel zur Entfernung
des gebundenen Peptids mit einem Stripping-Puffer,
10 pH-Wert 3,0, enthaltend 50 mM Natriumcitrat, über
einen Zeitraum von weniger als 20 s, vorzugsweise
10 s, behandelt werden.

41. Verfahren nach Anspruch 40, wobei im Falle,
dass der Rezeptor-Peptid-Komplex allein durch Bin-
dung der ersten funktionellen Gruppe an die zweite
15 funktionelle Gruppe der Nanopartikel immobilisiert
ist, bei der Behandlung der erhaltenen Nanopartikel
neben dem Peptid auch die zweite Rezeptor-Einheit
von den Nanopartikeln entfernt wird und Nanoparti-
kel mit der immobilisierten ersten Rezeptor-Einheit
20 erhalten werden.

42. Verfahren nach Anspruch 40, wobei im Falle,
dass der Rezeptor-Peptid-Komplex durch Bindung der
ersten funktionellen Gruppe der ersten Rezeptor-
Einheit an die zweite funktionelle Gruppe der Nano-
25 partikel und Bindung der dritten funktionellen
Gruppe der zweiten Rezeptor-Einheit an die vierte
funktionelle Gruppe der Nanopartikel an den Nano-
partikeln immobilisiert ist, bei der Behandlung der
erhaltenen Nanopartikel allein das gebundene Peptid
30 von den Nanopartikeln entfernt wird und Nanoparti-

kel mit der immobilisierten ersten und zweiten Rezeptor-Einheit erhalten werden.

43. Verfahren nach einem der Ansprüche 35 bis 42, wobei die immobilisierte(n) Rezeptoreinheit(en) aufweisenden Nanopartikel mittels mindestens einer Zentrifugation und mindestens eines Waschvorgangs vom Puffer abgetrennt und erneut in einem Puffer suspendiert werden.

44. Verfahren nach einem der Ansprüche 35 bis 43, wobei die kompetitive Bindung der Peptidfragment-Population an die Nanopartikel, die die erste oder die erste und zweite immobilisierte Rezeptor-Einheit aufweisen, mittels Inkubation der Peptidfragment-Population mit den Nanopartikeln in einem PBS-Puffer über einen Zeitraum von 2 h bis 6 h, vorzugsweise 4 h, bei einer Temperatur von Raumtemperatur bis 39°C, vorzugsweise 37°C, durchgeführt wird.

45. Verfahren nach Anspruch 44, wobei der PBS-Puffer die zweite Rezeptor-Einheit enthält, falls die Nanopartikel allein die immobilisierte erste Rezeptor-Einheit aufweisen.

46. Verfahren nach Anspruch 44 oder 45, wobei die Nanopartikel nach Bindung des Peptid-Fragmentes mit der höchsten Affinität zu den beiden Rezeptoreinheiten unter Bildung eines immobilisierten Rezeptor-Peptidfragment-Komplexes mittels mindestens einer Zentrifugation und mindestens eines Waschvorgangs vom Puffer und den nicht gebundenen Peptid-

Fragmenten abgetrennt und erneut in einem Puffer suspendiert werden.

47. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 46, wobei die Suspension der Nanopartikel, die den immobilisierten Rezeptor-Peptidfragment-Komplex mit dem gebundenen Peptid-Fragment aufweisen, mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorptions/Ionisations (MALDI)-Verfahren, insbesondere MALDI-TOF (Flugzeit)-Verfahrens analysiert wird.
48. Verfahren nach Anspruch 47, wobei die erhaltene Nanopartikel-Suspension nach Zentrifugieren und Waschen auf einem MALDI-Probenträger abgeschieden und analysiert wird.
49. Verfahren nach Anspruch 47 oder 48, wobei eine im Verlauf des MALDI-Verfahrens eingesetzte Matrix vor oder nach dem Abscheiden der Nanopartikelhaltigen Suspension oder gemeinsam damit auf den MALDI-Probenträger aufgetragen wird.
50. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 46, wobei das in dem immobilisierten Rezeptor-Peptidfragment-Komplex gebundene Peptid-Fragment aus dem Komplex herausgelöst, isoliert und analysiert wird.
51. Verfahren nach Anspruch 50, wobei die den immobilisierten Rezeptor-Peptidfragment-Komplex aufweisenden Nanopartikel mit einem Stripping-Puffer, pH-Wert 3,0, enthaltend 50 mM Natriumcitrat, über einen Zeitraum von weniger als 20 s, vorzugsweise 10 s, behandelt werden und das Peptidfragment in Lösung geht.

52. Verfahren nach Anspruch 50 oder 51, wobei die Nanopartikel mittels Zentrifugation von der das Peptid-Fragment enthaltenden Lösung abgetrennt werden.
- 5 53. Verfahren nach einem der Ansprüche 50 bis 52, wobei die das freigesetzte Peptid-Fragment enthaltende Lösung mit Nanopartikeln in Kontakt gebracht werden, die die fünfte funktionelle Gruppe des Peptid-Fragments bindende sechste funktionelle Gruppen aufweisen, so dass das Peptid-Fragment durch Bindung der fünften funktionellen Gruppe an die sechste funktionelle Gruppe an den Nanopartikel immobilisiert, und die das immobilisierte Peptid-Fragment aufweisenden Nanopartikel von der Lösung abgetrennt werden.
- 10 54. Verfahren nach einem der Ansprüche 50 bis 53, wobei das immobilisierte Peptid-Fragment von den Nanopartikeln abgetrennt und sequenziert wird.
- 15 55. Verfahren zur Identifizierung und/oder Herstellung eines Peptid-Impfstoffes gegen ein Protein-Antigen, wobei die Aminosäuresequenz eines T-Zell-Epitops des Protein-Antigens in vitro identifiziert, ein Peptid mit der identifizierten Aminosäuresequenz hergestellt und unter Verwendung des hergestellten Peptids und einer ersten und zweiten Kette ein Peptid-präsentierender Haupthistokompatibilitäts-komplex (MHC) hergestellt wird, umfassend
- 20 a) Bereitstellung einer Population von Peptid-Fragmenten des Protein-Antigens,
- 25

- 5 b) Bereitstellung von Nanopartikeln, die an ihrer Oberfläche mindestens eine erste immobilisierte Kette eines MHC-Moleküls aufweisen, wobei die Kette eine die Bildung eines MHC-Moleküls ermöglichende Konformation aufweist,
- 10 c) Durchführung einer kompetitiven Bindung der Peptidfragment-Population an die an den Nanopartikeln immobilisierte erste Kette in Gegenwart einer zweiten Kette eines MHC-Moleküls, wobei das Peptid-Fragment mit der größten Affinität zu den beiden Ketten des MHC-Moleküls zusammen mit der zweiten Kette an die erste Kette bindet und ein Peptidfragment-präsentierendes MHC-Molekül erhalten wird, und

15
- 20 d) Isolierung des Peptid-Fragments aus dem MHC-Molekül zur Identifizierung eines für einen Peptid-Impfstoff geeignetes Peptid-Fragments und Bestimmung seiner Aminosäuresequenz, und optionale Durchführung der Schritte e) bis h), nämlich
- 25 e) gentechnische Herstellung oder chemische Synthese eines Peptides auf der Basis der bestimmten Aminosäuresequenz des Peptid-Fragmentes in geeigneten Mengen,
- 30 f) gentechnische Herstellung oder chemische Synthese der ersten und zweiten Kette in geeigneten Mengen,
- 30 g) Herstellung von Peptid-präsentierenden MHC-Molekülen in geeigneten Mengen durch gemein-

same Inkubation der ersten Kette, der zweiten Kette und des hergestellten Peptids, und

- 5 h) Herstellung eines Peptid-Impfstoffes in Form eines Lyophilisats oder einer wässrigen kolloidalen Lösung oder Suspension der Peptid-präsentierenden MHC-Moleküle.

56. Verfahren nach Anspruch 55, wobei an der Oberfläche der Nanopartikel neben der ersten Kette auch die zweite Kette immobilisiert ist.

- 10 57. Verfahren nach Anspruch 55 oder 56, wobei die beiden Ketten in Form eines das MHC-Molekül bildenden Dimers an der Nanopartikel-Oberfläche immobilisiert sind.

- 15 58. Verfahren nach einem der Ansprüche 55 bis 57, wobei die Population von Peptid-Fragmenten des Protein-Antigens mittels enzymatischer Protein-Spaltung, gentechnischer Verfahren oder chemischer Syntheseverfahren hergestellt wird.

- 20 59. Verfahren nach Anspruch 58, wobei die Peptid-Fragmente der Population die gesamte Aminosäuresequenz des Protein-Antigens vollständig repräsentieren.

- 25 60. Verfahren nach Anspruch 58, wobei die Peptid-Fragmente der Population die Aminosäuresequenz des Protein-Antigens nur teilweise repräsentieren.

61. Verfahren nach Anspruch 60, wobei die Peptid-Fragmente der Population Aminosäuresequenzen auf-

weisen, die mittels eines Computer-Algorithmus bestimmte potentielle T-Zell-Epitope darstellen.

62. Verfahren nach einem der Ansprüche 58 bis 61, wobei die Peptid-Fragmente oder das Peptid eine Länge von 8 bis 10 Aminosäuren aufweisen, wenn das herzustellende Peptidfragment- oder Peptid-präsentierende MHC-Molekül ein MHC-Molekül Typ I ist, oder eine Länge von 15 bis 24 Aminosäuren, wenn das herzustellende Peptidfragment- oder Peptid-präsentierende MHC-Molekül ein MHC-Molekül Typ II ist.

63. Verfahren nach einem der Ansprüche 55 bis 62, wobei die erste Kette eine schwere Kette von etwa 45 kD ist, die zweite Kette eine leichte Kette von etwa 12 kD ist und beide Ketten ein MHC-Molekül Typ I bilden können.

64. Verfahren nach Anspruch 63, wobei die erste Kette ein HLA-A-, HLA-B- oder HLA-C-Monomer ist und die zweite Kette β -2-Microglobulin.

65. Verfahren nach einem der Ansprüche 55 bis 62, wobei die erste Kette eine α -Kette von etwa 34 kD ist, die zweite Kette eine β -Kette von etwa 30 kD ist und beide Ketten ein MHC-Molekül Typ II bilden können.

66. Verfahren nach Anspruch 65, wobei die erste Kette und die zweite Kette HLA-DR-, HLA-DQ- oder HLA-DP-Monomere sind.

67. Verfahren nach einem der Ansprüche 55 bis 66, wobei die erste Kette eine erste funktionelle Grup-

pe enthält und durch Bindung der ersten funktionellen Gruppe an eine auf der Oberfläche der Nanopartikel vorhandene zweite funktionelle Gruppe an der Oberfläche der Nanopartikel immobilisiert ist.

5 68. Verfahren nach einem der Ansprüche 55 bis 67, wobei die zweite Kette eine dritte funktionelle Gruppe enthält und durch Bindung der dritten funktionellen Gruppe an eine auf der Oberfläche der Nanopartikel vorhandene vierte funktionelle Gruppe an
10 der Oberfläche der Nanopartikel immobilisiert ist.

69. Verfahren nach Anspruch 67, wobei die erste funktionelle Gruppe ein natürlicher Bestandteil der ersten Kette ist oder mittels gentechnischer Verfahren, biochemischer, enzymatischer und/oder chemischer Derivatisierung oder chemischer Syntheseverfahren in die erste Kette eingeführt ist.
15

70. Verfahren nach Anspruch 68, wobei die dritte funktionelle Gruppe ein natürlicher Bestandteil der zweiten Kette ist oder mittels gentechnischer Verfahren, biochemischer, enzymatischer und/oder chemischer Derivatisierung oder chemischer Syntheseverfahren in die zweite Kette eingeführt ist.
20

71. Verfahren nach Anspruch 69 oder 70, wobei sich die erste und dritte funktionelle Gruppe voneinander unterscheiden und ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Carboxy-Gruppen, Amino-Gruppen, Thiol-Gruppen, Biotin-Gruppen, His-Tag, FLAG-Tag, Strep-Tag I-Gruppen, Strep-Tag II-Gruppen, Histidin-Tag-Gruppen und FLAG-Tag-Gruppen.
25

72. Verfahren nach einem der Ansprüche 67 oder 68, wobei sich die an der Oberfläche der Nanopartikel vorhandenen zweiten und vierten funktionellen Gruppen voneinander unterscheiden und ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Amino-Gruppen, Carboxy-Gruppen, Maleinimido-Gruppen, Avidin-Gruppen, Streptavidin-Gruppen, Neutravidin-Gruppen und Metallchelatkomplex.

73. Verfahren nach Anspruch 72, wobei die zweite und vierte funktionelle Gruppe mittels Pfropfsilanisierung, Silanisierung, chemischer Derivatisierung und ähnlicher geeigneter Verfahren auf die Oberfläche der Nanopartikel aufgebracht sind.

74. Verfahren nach Anspruch 72 oder 73, wobei die Nanopartikel einen Kern aus einem chemisch inerten Material, vorzugsweise Silica, und einen Durchmesser von 30 bis 400 nm, vorzugsweise 50 nm bis 150 nm, aufweisen.

75. Verfahren nach einem der Ansprüche 55 bis 74, wobei die an ihrer Oberfläche eine erste immobilisierte Kette aufweisenden Nanopartikel durch folgende Schritte erhalten werden:

a) Inkubation der die erste funktionelle Gruppe enthaltenden ersten Kette, der zweiten Kette und eines Peptids, von dem die Aminosäuresequenz und die Fähigkeit zur Bildung eines Peptid-präsentierenden MHC-Moleküls unter geeigneten Bedingungen bekannt ist,

b) Inkubation des Peptid-präsentierenden MHC-Moleküls mit Nanopartikeln, deren Oberfläche

mindestens eine die erste funktionelle Gruppe bindende zweite funktionelle Gruppe aufweist, unter geeigneten Bedingungen zur Immobilisierung des Peptid-präsentierenden MHC-Moleküls an den Nanopartikeln,

5

c) Behandlung der Nanopartikel mit den immobilisierten Peptid-präsentierenden MHC-Molekülen mit einem geeigneten Puffer zur Entfernung der zweiten Kette und des Peptids bekannter Aminosäuresequenz aus dem immobilisierten MHC-Molekül,

10

d) Aufreinigung der die erste immobilisierte Kette aufweisenden Nanopartikel.

15

76. Verfahren nach einem der Ansprüche 55 bis 75, wobei die kompetitive Bindung der Peptidfragment-Population an die die erste immobilisierte Kette aufweisenden Nanopartikel mittels Inkubation der Peptidfragment-Population mit den Nanopartikeln in einem geeigneten Puffer unter geeigneten Bedingungen erfolgt.

20

25

77. Verfahren nach einem der Ansprüche 55 bis 76, wobei die Nanopartikel nach Bindung des die höchste Affinität aufweisenden Peptid-Fragmentes der Population und der zweiten Kette unter Bildung eines immobilisierten Peptidfragment-präsentierenden MHC-Moleküls mittels Zentrifugation und Waschen vom Puffer und den nicht gebundenen Peptid-Fragmenten abgetrennt werden.

30

78. Verfahren nach einem der Ansprüche 55 bis 77, wobei die das immobilisierte Peptidfragment-

präsentierende MHC-Molekül aufweisenden Nanopartikel mit einem geeigneten Puffer zur Freisetzung des gebundenen Peptid-Fragmentes behandelt werden.

79. Verfahren nach einem der Ansprüche 55 bis 78, wobei das freigesetzte Peptid-Fragment isoliert und seine Aminosäuresequenz ermittelt wird.

80. Verfahren nach einem der Ansprüche 55 bis 79, wobei auf der Basis der ermittelten Aminosäuresequenz des freigesetzten Peptid-Fragmentes eine die ermittelte Aminosäuresequenz codierende Nucleinsäure erzeugt und in einen geeigneten Expressionsvektor inseriert, der die Nucleinsäure enthaltende Vektor in eine geeignete Wirtszelle zur Expression der Aminosäuresequenz überführt und ein Peptid mit der Aminosäuresequenz des Peptid-Fragmentes in der Wirtszelle, vorzugsweise in größerer Menge, exprimiert und daraus isoliert wird.

81. Verfahren nach einem der Ansprüche 55 bis 79, wobei auf der Basis der ermittelten Aminosäuresequenz des freigesetzten Peptid-Fragmentes eine geeignete Menge eines Peptids mit der Aminosäuresequenz des Peptid-Fragmentes chemisch synthetisiert wird.

82. Verfahren zur Qualitätskontrolle von Rezeptor-Ligand-Komplexen und/oder deren Bestandteilen, umfassend die Herstellung oder Bereitstellung eines Rezeptor-Ligand-Komplexes in Lösung aus zwei Rezeptor-Einheiten, wobei mindestens eine Rezeptor-Einheit eine erste funktionelle Gruppe aufweist, und eines Liganden, die Immobilisierung des Rezep-

tor-Ligand-Komplexes an Nanopartikeln, die an ihrer Oberfläche mindestens eine die erste funktionelle Gruppe bindende zweite funktionelle Gruppe aufweisen, und Analyse der den immobilisierten Rezeptor-Ligand-Komplex aufweisenden Nanopartikel unter Verwendung eines MALDI-Verfahrens.

83. Verfahren nach Anspruch 82, wobei der Rezeptor ein MHC-Molekül, der Ligand ein an den Rezeptor bindendes Peptid bekannter Sequenz und definierter Länge und der Rezeptor-Ligand-Komplex ein Peptid-präsentierendes MHC-Molekül ist.

84. Verfahren nach Anspruch 82 oder 83, wobei der Rezeptor ein MHC-Molekül der Klasse I, eine Rezeptor-Einheit eine schwere Kette von etwa 45 kDa und die Rezeptor-Einheit eine leichte Kette von etwa 12 kDa ist.

85. Verfahren nach Anspruch 84, wobei die schwere Kette ein HLA-A-, HLA-B- oder HLA-C-Monomer und die leichte Kette β -2-Microglobulin ist.

86. Verfahren nach Anspruch 82 oder 83, wobei der Rezeptor ein MHC-Molekül der Klasse II, eine Rezeptor-Einheit eine α -Kette von etwa 34 kDa und eine Rezeptor-Einheit eine β -Kette von etwa 30 kDa ist.

87. Verfahren nach Anspruch 86, wobei die α -Kette und die β -Kette HLA-DR-, HLA-DQ- oder HLA-DP-Monomere sind.

88. Verfahren nach einem der Ansprüche 82 bis 87, wobei das MALDI-Verfahren ein MALDI-TOF-Verfahren ist.

89. Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln, die an ihrer Oberfläche mindestens eine immobilisierte Rezeptor-Einheit oder einen immobilisierten Rezeptor aufweisen, umfassend

- 5 a) Herstellung eines Rezeptor-Ligand-Komplexes durch Inkubation einer ersten Rezeptor-Einheit mit einer ersten funktionellen Gruppe, einer zweiten Rezeptor-Einheit, die mit der ersten Rezeptor-Einheit einen Re-
10 zeptor bilden kann, und eines Liganden in Lösung,
- b) Immobilisierung des gebildeten Rezeptor-Ligand-Komplexes an Nanopartikeln, die min-
15 destens eine die erste funktionelle Gruppe bindende zweite funktionelle Gruppen an der Oberfläche aufweisen, und
- c) Behandlung der den immobilisierten Rezep-
20 tor-Ligand-Komplex aufweisenden Nanoparti-
 kel mit einem sauren Puffer zur Freisetzung mindestens des gebundenen Liganden, wobei Nanopartikel mit immobilisierten Rezeptor-Einheiten erhalten werden.

25 90. Verfahren nach Anspruch 89, wobei die Immobilisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes an der Nanopartikel-Oberfläche allein über die Bindung der ersten funktionellen Gruppe der ersten Rezeptor-Einheit an die zweite funktionelle Gruppe der Nanopartikel erfolgt.

30 91. Verfahren nach Anspruch 89 oder 90, wobei nach Behandlung der den immobilisierten Rezeptor-Ligand-

Komplex aufweisenden Nanopartikel mit einem sauren Puffer neben dem Liganden auch die zweite Rezeptor-Einheit freigesetzt und Nanopartikel mit der immobilisierten ersten Rezeptor-Einheit erhalten werden.
5

92. Verfahren nach Anspruch 89, wobei die zweite Rezeptor-Einheit eine dritte funktionelle Gruppe aufweist und die Nanopartikel an ihrer Oberfläche eine die dritte funktionelle Gruppe der zweiten Rezeptor-Einheit bindende vierte funktionelle Gruppe aufweisen, so dass die Immobilisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes an den Nanopartikeln über die Bindung der ersten funktionellen Gruppe der ersten Rezeptor-Einheit an die zweite funktionelle Gruppe der Nanopartikel und die Bindung der dritten funktionellen Gruppe der zweiten Rezeptor-Einheit an die vierte funktionelle Gruppe der Nanopartikel erfolgt.
10
15

93. Verfahren nach Anspruch 92, wobei nach Behandlung der den immobilisierten Rezeptor-Ligand-Komplex aufweisenden Nanopartikel mit einem sauren Puffer allein der Ligand freigesetzt und Nanopartikel mit der immobilisierten ersten und zweiten Rezeptor-Einheit erhalten werden.
20

94. Verfahren nach Anspruch 92 oder 93, wobei die erste und zweite Rezeptor-Einheit gerichtet immobilisiert vorliegen und einen Rezeptor bilden, der einen Liganden binden kann.
25

95. Verfahren nach einem der Ansprüche 89 bis 94, wobei der Rezeptor ein MHC-Molekül, der Ligand ein
30

an den Rezeptor bindendes Peptid bekannter Sequenz und definierter Länge und der Rezeptor-Ligand-Komplex ein Peptid-präsentierendes MHC-Molekül ist.

5 96. Verfahren nach Anspruch 95, wobei der Rezeptor ein MHC-Molekül der Klasse I ist.

10 97. Verfahren nach Anspruch 95 oder 96, wobei die erste Rezeptor-Einheit eine schwere Kette von etwa 45 kDa und die zweite Rezeptor-Einheit eine leichte Kette von etwa 12 kDa ist oder die erste Rezeptor-Einheit eine leichte Kette von etwa 12 kDa und die zweite Rezeptor-Einheit eine schwere Kette von etwa 45 kDa ist.

15 98. Verfahren nach Anspruch 97, wobei die schwere Kette ein HLA-A-, HLA-B- oder HLA-C-Monomer und die leichte Kette β -2-Microglobulin ist.

99. Verfahren nach Anspruch 95, wobei der Rezeptor ein MHC-Molekül der Klasse II ist.

20 100. Verfahren nach Anspruch 99, wobei die erste Rezeptor-Einheit eine α -Kette von etwa 34 kDa und die zweite Rezeptor-Einheit eine β -Kette von etwa 30 kDa ist oder die erste Rezeptor-Einheit eine β -Kette von etwa 30 kDa und die zweite Rezeptor-Einheit eine α -Kette von etwa 34 kDa ist.

25 101. Verfahren nach Anspruch 100, wobei die α -Kette und die β -Kette HLA-DR-, HLA-DQ- oder HLA-DP-Monomere sind.

102. Verfahren nach einem der Ansprüche 89 bis 101, wobei sich die erste funktionelle Gruppe und die

5 dritte funktionelle Gruppe voneinander unterscheiden und ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Carboxy-Gruppen, Amino-Gruppen, Thiol-Gruppen, Biotin-Gruppen, His-Tag, FLAG-Tag, Strep-Tag I-Gruppen, Strep-Tag II-Gruppen, Histidin-Tag-Gruppen und FLAG-Tag-Gruppen.

10 103. Verfahren nach einem der Ansprüche 89 bis 102, wobei sich die zweite funktionelle Gruppe an der Nanopartikel-Oberfläche, die die erste funktionelle Gruppe bindet, und die vierte funktionelle Gruppe an der Nanopartikel-Oberfläche, die die dritte funktionelle Gruppe bindet, voneinander unterscheiden und ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Amino-Gruppen, Carboxy-Gruppen, Maleinimido-Gruppen, Avidin-Gruppen, Streptavidin-Gruppen, Neutravidin-Gruppen und Metallchelatkomplex.

20 104. Verfahren nach einem der Ansprüche 89 bis 103, wobei die den immobilisierten Rezeptor-Peptid-Komplex aufweisenden Nanopartikel zur Entfernung des gebundenen Peptids mit einem Stripping-Puffer, pH-Wert 3,0, enthaltend 50 mM Natriumcitrat, über einen Zeitraum von weniger als 20 s, vorzugsweise 10 s, behandelt werden.

25 105. Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln mit immobilisierten Peptid-präsentierenden MHC-Molekülen, wobei Nanopartikel mit mindestens einer ersten immobilisierten Kette eines MHC-Moleküls, herstellbar nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 89 bis 104, in Gegenwart einer zweiten Kette, die mit der ersten Kette ein MHC-Molekül bilden kann, mit einem Peptid, das an das MHC-Molekül bin-

30

den kann, inkubiert und ein an den Nanopartikeln immobilisierter Peptid-präsentierendes MHC-Molekül erhalten wird.

5 106. Verfahren nach Anspruch 105, wobei das MHC-Molekül ein Molekül der Klasse I ist und das Peptid eine Länge von etwa 8 bis etwa 10 Aminosäuren aufweist.

10 107. Verfahren nach Anspruch 105, wobei das MHC-Molekül ein Molekül der Klasse II ist und das Peptid eine Länge von etwa 15 bis etwa 24 Aminosäuren aufweist.

15 108. Verfahren zur Anreicherung und/oder Isolierung spezifischer $CD4^+$ -T-Lymphocyten oder $CD8^+$ -T-Lymphocyten aus peripheren mononucleären Blutzellen (PBMCs), umfassend

- a) Herstellung von Nanopartikeln mit immobilisierten Peptid-präsentierenden MHC-Molekülen nach einem der Ansprüche 105 bis 107, wobei das Peptid ein T-Zell-Epitop ist
- 20 b) Isolierung peripherer mononucleärer Blutzellen aus einem geeigneten Ausgangsmaterial,
- c) Inkubation der isolierten mononucleärer Blutzellen mit den die immobilisierten Peptid-präsentierenden MHC-Molekülen aufweisenden Nanopartikeln, wobei T-Lymphocyten an das T-Zell-Epitop der immobilisierten Peptid-präsentierenden MHC-Moleküle binden,
- 25

- 5 d) Abtrennung der Nanopartikel mit den an die immobilisierten Peptid-präsentierenden MHC-Molekülen gebundenen T-Lymphozyten von den nicht-gebundenen peripheren mononucleären Zellen.

109. Verfahren nach Anspruch 108, wobei die gebundenen T-Lymphozyten von den Nanopartikeln freigesetzt werden.

- 10 110. Verfahren nach Anspruch 109, wobei die freigesetzten T-Lymphozyten in vitro clonal vermehrt werden.

111. Verfahren nach Anspruch 109 oder 110, wobei die freigesetzten und/oder clonal vermehrten T-Lymphozyten in einen Organismus eingeführt werden.

- 15 112. Verfahren nach einem der Ansprüche 108 bis 111, wobei das Peptid-präsentierende MHC-Molekül ein Molekül der Klasse I ist und die gebundenen T-Lymphozyten CD8⁺-T-Lymphocyten sind.

- 20 113. Verfahren nach einem der Ansprüche 108 bis 111, wobei das Peptid-präsentierende MHC-Molekül ein Molekül der Klasse II ist und die gebundenen T-Lymphozyten CD4⁺-T-Lymphocyten sind.

- 25 114. Verfahren zum Primen und/oder Restimulieren einer CD4⁺-T- oder CD8⁺-T-Lymphocyten-Reaktion in vitro, umfassend

a) Identifizierung eines T-Zell-Epitops nach einem der Ansprüche 1 bis 54 und Bestimmung von dessen Aminosäuresequenz,

- b) Herstellung einer Nucleinsäure, die ein Peptid mit der Aminosäuresequenz des T-Zell-Epitops codiert,
- 5 c) Einführung der bei b) hergestellten Nucleinsäure in einen geeigneten Vektor,
- d) Einführung des bei c) erhaltenen Vektors in dendritische Zellen, die gegebenenfalls aus kultivierten peripheren mononucleären Blutzellen isoliert wurden,
- 10 e) Vermehrung der bei d) resultierenden, den Vektor aufweisenden dendritischen Zellen in vitro, und
- f) Stimulation autologer $CD4^+$ und/oder $CD8^+$ -Zellen in vitro unter Verwendung der bei d) oder e) erhaltenen dendritischen Zellen.
- 15

115. Nanopartikel, enthaltend an der Oberfläche mindestens eine Rezeptor-Einheit, insbesondere eine immobilisierte Kette eines MHC-Moleküls.

- 20 116. Nanopartikel nach Anspruch 115, wobei die immobilisierte Kette durch Bindung eines Peptids von 8 bis 24 Aminosäuren und einer zweiten Kette eines MHC-Moleküls ein Peptid-präsentierendes MHC-Molekül bilden kann.

- 25 117. Nanopartikel nach Anspruch 115 oder 116, wobei die MHC-Molekül-Kette durch Bindung einer in ihr enthaltenen ersten funktionellen Gruppe mit einer an der Nanopartikel-Oberfläche vorhandenen zweiten

funktionellen Gruppe an der Nanopartikel-Oberfläche immobilisiert ist.

118. Nanopartikel nach einem der Ansprüche 115 bis 117, wobei das MHC-Molekül ein Molekül der Klasse I ist und aus einer schweren Kette von etwa 45 kDa und einer leichten Kette von etwa 12 kDa besteht.

119. Nanopartikel nach Anspruch 118, wobei entweder die schwere Kette oder die leichte Kette immobilisiert ist.

120. Nanopartikel nach einem der Ansprüche 115 bis 117, wobei das MHC-Molekül ein Molekül der Klasse II ist und aus einer α -Kette von etwa 34 kDa und einer β -Kette von etwa 30 kDa besteht.

121. Nanopartikel nach Anspruch 120, wobei entweder die α -Kette oder die β -Kette immobilisiert ist.

122. Nanopartikel mit einem immobilisierten MHC-Molekül, wobei das MHC-Molekül eine erste und zweite Kette umfasst und das MHC-Molekül durch Bindung einer in der ersten Kette enthaltenen ersten funktionellen Gruppe mit einer an der Nanopartikel-Oberfläche vorhandenen zweiten funktionellen Gruppe oder durch Bindung der in der ersten Kette enthaltenen ersten funktionellen Gruppe mit der an der Nanopartikel-Oberfläche vorhandenen zweiten funktionellen Gruppe und Bindung einer in der zweiten Kette enthaltenen dritten funktionellen Gruppe mit einer an der Nanopartikel-Oberfläche vorhandenen vierten funktionellen Gruppe an der Nanopartikel-Oberfläche immobilisiert ist.

123. Nanopartikel mit einem an der Nanopartikel-Oberfläche immobilisierten Peptid-präsentierenden MHC-Molekül, wobei das Peptid-präsentierende MHC-Molekül eine erste Kette, eine zweite Kette und ein
 5 Peptid von 8 bis 24 Aminosäuren umfasst und das MHC-Molekül durch Bindung einer in der ersten Kette enthaltenen ersten funktionellen Gruppe mit einer an der Nanopartikel-Oberfläche vorhandenen zweiten funktionellen Gruppe oder durch Bindung der in der
 10 ersten Kette enthaltenen ersten funktionellen Gruppe mit der an der Nanopartikel-Oberfläche vorhandenen zweiten funktionellen Gruppe und Bindung einer in der zweiten Kette enthaltenen dritten funktionellen Gruppe mit einer an der Nanopartikel-Oberfläche vorhandenen vierten funktionellen Gruppe
 15 an der Nanopartikel-Oberfläche immobilisiert ist.

124. Nanopartikel nach Anspruch 122 oder 123, wobei das MHC-Molekül ein Molekül der Klasse I ist und aus einer schweren Kette von etwa 45 kDa und einer
 20 leichten Kette von etwa 12 kDa besteht.

125. Nanopartikel nach Anspruch 124, wobei die erste Kette die schwere Kette und die zweite Kette die leichte Kette ist oder wobei die erste Kette die leichte Kette und die zweite Kette die schwere Kette
 25 te ist.

126. Nanopartikel nach Anspruch 122 oder 123, wobei das MHC-Molekül ein Molekül der Klasse II ist und aus einer α -Kette von etwa 34 kDa und einer β -Kette von etwa 30 kDa besteht.

127. Nanopartikel nach Anspruch 126, wobei die erste Kette die α -Kette und die zweite Kette die β -Kette ist oder wobei die erste Kette die β -Kette und die zweite Kette die α -Kette ist.

5 128. Peptid-Impfstoff umfassend mindestens ein Peptid-präsentierendes MHC-Molekül, herstellbar nach einem der Ansprüche 55 bis 81 und/oder umfassend mindestens ein Protein-Antigen enthaltend ein gemäß
10 der Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 54 identifiziertes T-Zell-Epitop.

129. Peptid-Impfstoff nach Anspruch 128, wobei der Impfstoff als Lyophilisat vorliegt.

130. Peptid-Impfstoff nach Anspruch 128, wobei der Impfstoff als wässrige kolloidale Lösung oder Suspension vorliegt.
15

131. Peptid-Impfstoff nach einem der Ansprüche 128 bis 130, zusätzlich enthaltend mindestens ein Adjuvans.

132. Kit zur Identifizierung und/oder zum Nachweis
20 von T-Zell-Epitopen eines Protein-Antigens in vitro, umfassend einen Behälter mit einer Suspension von Nanopartikeln mit einem immobilisierten MHC-Molekül nach einem der Ansprüche 122 bis 127 oder einen Behälter mit einer Suspension von Nanopartikeln mit einer immobilisierten ersten Kette eines
25 MHC-Moleküls nach einem der Ansprüche 115 bis 121 und einen Behälter mit einem Lyophilisat einer zweiten Kette.

133. Verwendung eines Nanopartikels nach einem der Ansprüche 115 bis 127 zur Identifizierung und/oder zum Nachweis von T-Zell-Epitopen eines Protein-Antigens in vitro.

5 134. Verwendung eines Nanopartikels nach einem der Ansprüche 115 bis 127 zur Herstellung eines Peptid-Impfstoffes.

10 135. Verwendung eines Nanopartikels nach einem der Ansprüche 115 bis 127 zur Anreicherung und/oder Isolierung spezifischer CD4⁺-T-Lymphocyten oder CD8⁺-T-Lymphocyten in vitro.

15 136. Verwendung eines Nanopartikels nach einem der Ansprüche 115 bis 127 zum Primen oder/und Restimulieren einer CD4⁺- und/oder CD8⁺-T-Lymphocyten-Reaktion in vitro.

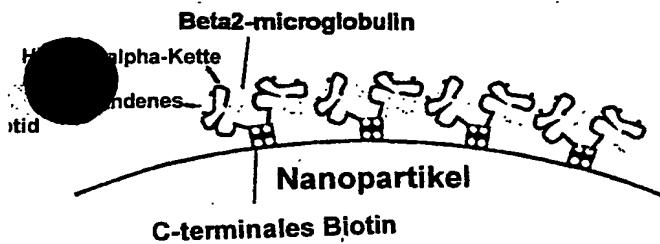
137. Verwendung eines Peptid-Impfstoffes nach einem der Ansprüche 128 bis 131 zur aktiven Immunisierung eines tierischen oder menschlichen Organismus gegen ein Protein-Antigen.

Zusammenfassung

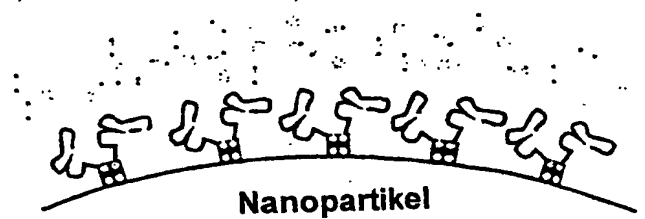
Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Identifizierung und/oder zum Nachweis von T-Zell-Epitopen eines Protein-Antigens, Verfahren zur Herstellung von Peptid-Impfstoffen gegen ein Protein-Antigen, Verfahren zur Qualitätskontrolle von Rezeptor-Ligand-Komplexen und/oder deren Bestandteilen, Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln mit mindestens einer immobilisierten Rezeptor-Einheit oder einem immobilisierten Rezeptor, Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln mit immobilisierten Rezeptor-Ligand-Komplexen, insbesondere Peptid-präsentierenden MHC-Molekülen, Verfahren zur Anreicherung und/oder Isolierung spezifischer CD4⁺-T- oder CD8⁺-T-Lymphozyten aus peripheren mononucleären Blutzellen, Verfahren zum Primen einer CD8⁺-T-Lymphozyten-Reaktion in vitro, Nanopartikel mit einer immobilisierten Rezeptor-Einheit, insbesondere einer immobilisierten Kette eines MHC-Moleküls, Nanopartikel mit einem immobilisierten Rezeptor, insbesondere einem immobilisierten MHC-Molekül, Nanopartikel mit einem immobilisierten Rezeptor-Ligand-Komplex, insbesondere einem Peptid-präsentierenden MHC-Molekül, einen Peptid-Impfstoff, einen Kit zur Identifizierung und/oder zum Nachweis von T-Zell-Epitopen eines Protein-Antigens, sowie die Verwendung der Nanopartikel zur Identifizierung und/oder zum Nachweis von T-Zell-Epitopen, zur Herstellung von Peptid-Impfstoffen, zur Anreicherung und/oder Isolierung spezifischer T-Lymphozyten sowie zum Primen einer CD8⁺-T-Lymphozyten-Reaktion in vitro.

Figur 1

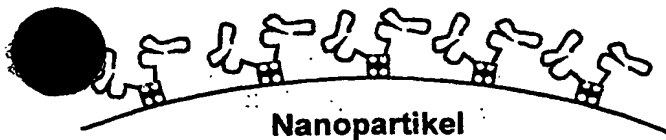
1. Bindung eines Peptid-präsentierenden HLA-A2-Komplexes



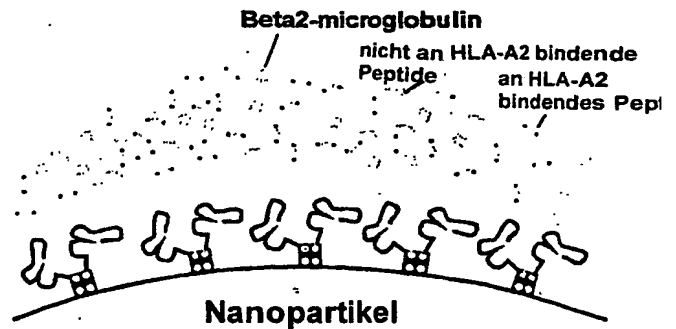
2. Behandlung mit „Stripping“-Puffer



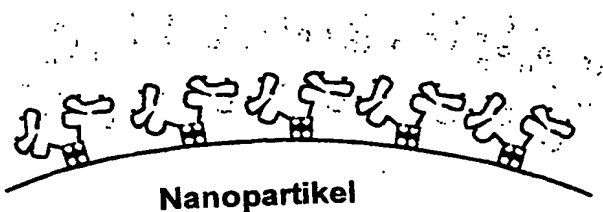
3. Entfernung des A2-Peptides und von β_2 -m vom immobilisierten Komplex



4. „Kompetitive Peptidbindung“

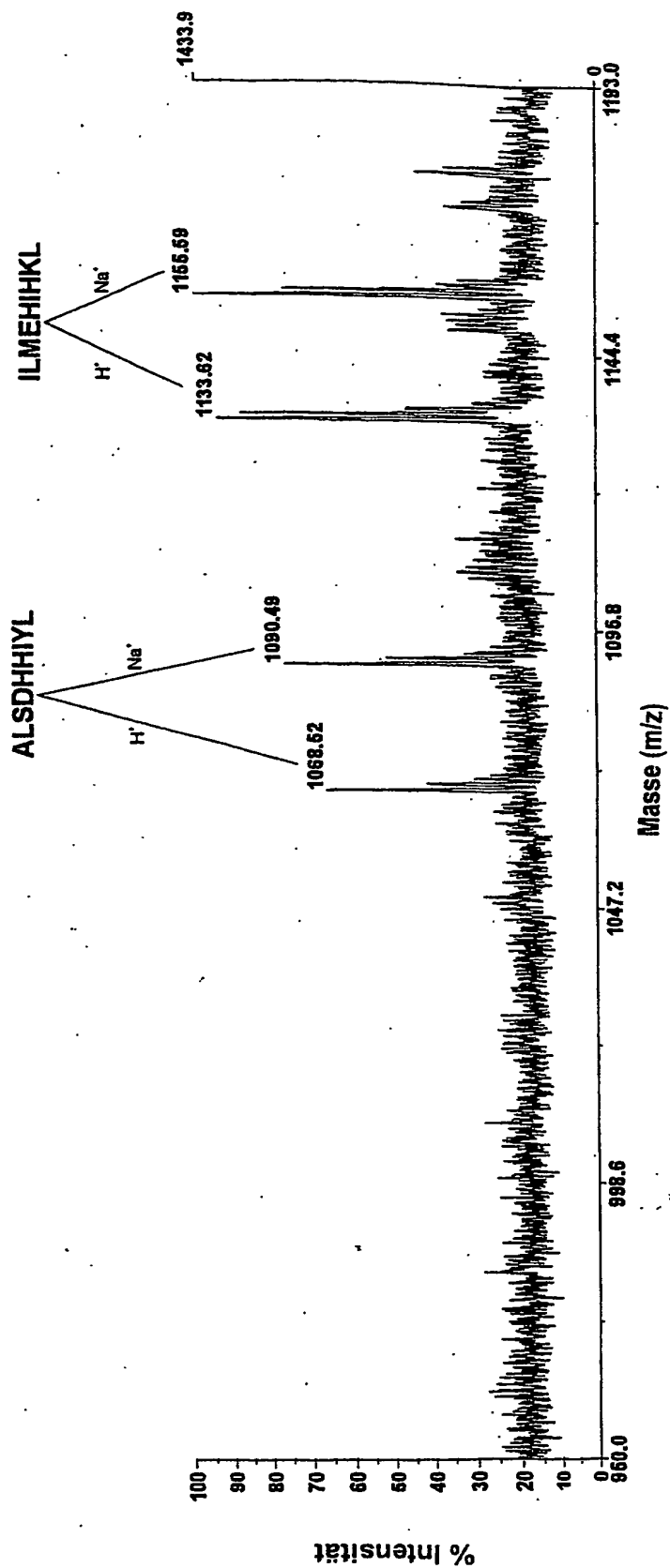
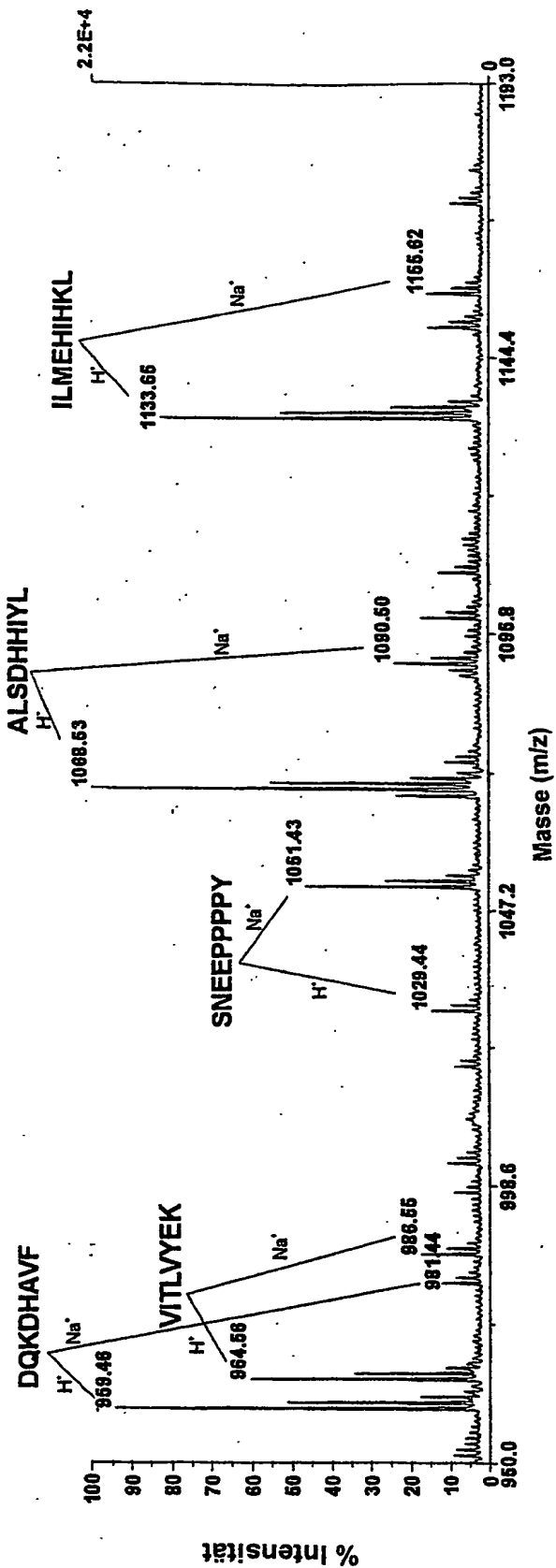


5. Entfernung der nicht-bindenden Peptide und überschüssigen β_2 -m

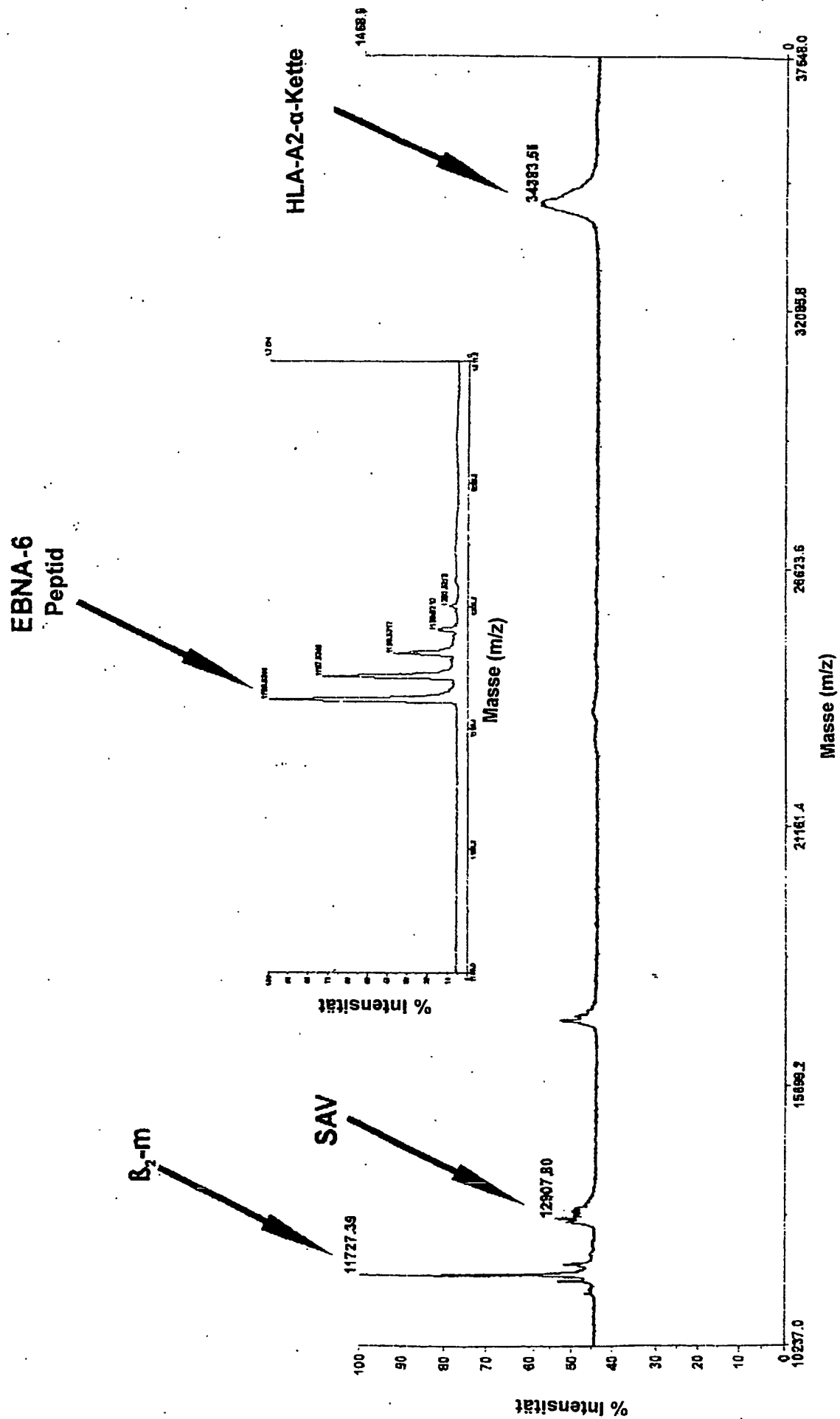


6. MALDI-Massenspektrometrie





Figur 3



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**